

كلية الصيدلة
السنة الرابعة
الفصل الثاني



البيولوجيا الجزيئية

القسم العملي

مدرس المقرر:
د. محمد ياسر عبجي

مقرر كامل





عدد الصفحات (52)

مكتبة NOFAL نوفل

د. محمد ياسر عبجي

الجلسة العملية الأولى

عزل الدنا الجينومي من عينة دم بشري

مقدمة:

يمكن عزل الدنا الجينومي من جميع الكائنات الحية سواء طليعيات النوى (جراثيم) أو حقيقيات النوى (كالكائنات العليا)، وتختلف طريقة العزل (بروتوكول العزل) تبعاً لنوع الكائن الحي و نوع الخلايا المأخوذة منه (عينة دم، عينة من الخلايا الظهارية المبطنة للفم، خلايا من جذر شعرة...إلخ).

بالرغم من الاختلافات في بروتوكولات عزل الدنا الجينومي و تفاصيل العزل و المحاليل المستخدمة إلا أنها تتفق جميعاً من حيث المبدأ باحتوائها على المراحل الآتية:

- حل الغشائين الخلوي و النووي لتحرير مكونات الخلية بما في ذلك الدنا، و يتم تحقيق ذلك باستخدام مواد فعالة سطحياً مثل ال SDS أو الـ Triton X-100.
- ترسيب البروتينات باستخدام درجات الحرارة العالية أو إنزيمات مثل Protease K.
- فصل البروتينات المترسبة و المكونات المحبة للدسم باستخلاصها بمحل عضوي (كلوروفورم أو فينول).
- فصل الدنا الجينومي و ذلك إما باستخدام أعمدة سيليكا ترتبط نوعياً الدنا، أو بترسيب الدنا الجينومي باستخدام الإيتانول أو الإيزوبروبانول.
- عمليات غسيل لاحقة لزيادة نقاوة الدنا.

أهداف عزل الدنا الجينومي؟

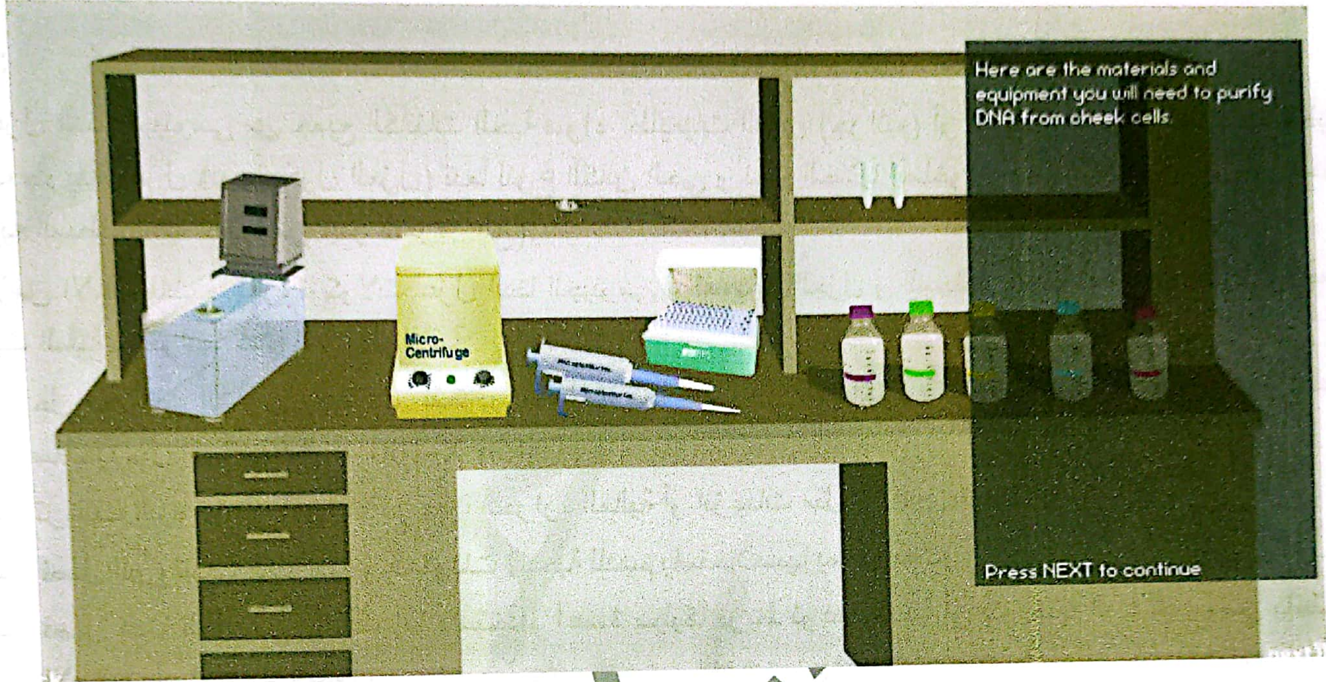
يستفاد من الدنا الجينومي المعزول في تطبيقات عدة نذكر منها على سبيل المثال لا الحصر:

- تحديد و تشخيص الكائنات الحية المجهولة (عامل ممرض معين أو عينة من كائن حي مجهول).
- في الطب الجنائي لتحديد هوية مجرم محتمل أو هوية الضحية في حال كانت لا تحمل وثائق تدل عليها.
- لإثبات صلة القربى بين فردين (أب و ابنه مثلاً).
- استخدام الدنا المعزول لتطبيقات أخرى كما في عمليات التنسيل cloning و التأشيب.
- تحديد التسلسل الكامل لجينومات الكائنات الحية (أصبح اليوم عدد كبير منها متوفرا في بنوك المعلومات على الإنترنت NCBI gene bank).
- في تشخيص الأمراض الوراثية و المعالجة الجينية للأمراض.

التجهيزات المخبرية:

- أدوات سحب الدم : سرينغات (محاقن) لسحب الدم، عاصبة مطاطية.
- حمام مائي (قابل للضبط).

- مثقلة أنابيب دقيقة (Micro centrifuge).
- طقم ماصات ميكروية (Micropipettes) مع رؤوس خاصة بها.
- أنابيب بلاستيكية سعة 1.5 مل مزودة بغطاء (Eppendorf).



المواد و المحاليل اللازمة:

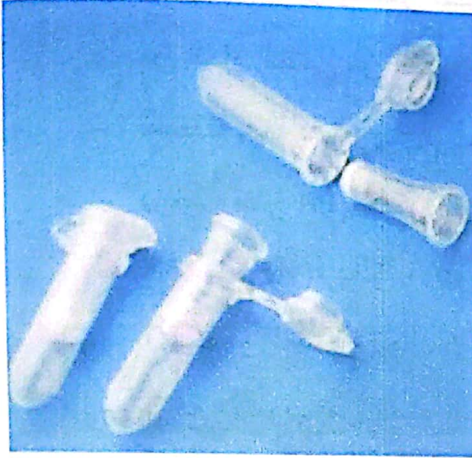
- قطن للتعقيم، محلول مطهر (كحول 70%) .
- كلوروفورم
- إيتانول مطلق مبرد (-20 م°).
- ماء مقطر عقيم (خالي من النكلياز nuclease free water و ذلك لتجنب تفكك الدنا الجينومي بفعل إنزيمات النكلياز).
- محلول كلوريد الصوديوم 2M
- محلول حل الخلايا lysis solution (LS) (مكون من:وقاء TE و SDS %10)
- محلول ترسيب الدنا precipitation solution (PS).

د. محمد ياسر عبجي
2022-2021

أولاً- عزل الدنا بطريقة الترسيب:

- قبل بداية العمل يحضر تمديد من محلول PS بأخذ 80 ميكرولتر من المحلول الاصلي و تمديدها بـ720 ميكرولتر من الماء الخالي من النكلياز.
- تسحب عينة دم وريدي و توضع في أنبوب دمويات (يحوي مضاد تخثر EDTA).
- يؤخذ مقدار 200 ميكرولتر من الدم و ينقل إلى أنبوب سعة 1.5 مل، و يضاف له 400 ميكرولترمن محلول حل الخلايا (LS)، يغلق الأنبوب و يقلب بلطف لمزج المكونات، ثم يحضن على حمام مائي في الدرجة 65 م° لمدة 10 دقائق لضمان تحلل كريات الدم و تحرر الدنا منها (الكريات البيضاء هي التي تحوي دنا جينومي).
- يرفع الأنبوب من الماء الساخن و يضاف للعينة 600 ميكرولتر كلوروفورم، و يغلق الأنبوب و يقلب للأسفل و الأعلى بلطف 3-5 مرات (التحريك الشديد يؤدي إلى تمزيق الدنا الجينومي).
- تثفل العينة بسرعة 2000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق. في نهاية التثفيل نحصل على طور مائي علوي (يحوي الدنا)، و طور عضوي سفلي يحوي المكونات المحبة للدسم.
- ينقل الطور العلوي إلى أنبوب جديد (سعة 1.5 مل) بوساطة الماصة المكروية و يضاف له 800 ميكرولتر من محلول الترسيب PS الممدد (في الخطوة الأولى) ، و نمزج بقلب الأنبوب للأسفل و الأعلى بلطف 3-5 مرات، ثم ندعه على الطاولة لمدة 5 دقائق حتى يترسب الدنا الجينومي.
- تثفل العينة بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق، لفصل رسابة الدنا الجينومي (الرسابة لا ترى بالعين المجردة لأن كمية الدنا الجينومي المستخلص هي من رتبة مكروغرام/مللتر).
- يفتح الأنبوب و يرمى الطور السائل بالكامل بلطف و حذر حتى لا نفقد رسابة الدنا.
- الخطوات التالية تهدف إلى زيادة نقاوة الدنا المعزول و لكن ستؤدي بالتأكيد إلى فقدان جزء بسيط من المردود عند العمل بحذر و تروي:
- تذاب رسابة الدنا الناتجة في 100 ميكرولتر من محلول كلوريد الصوديوم مع المزج اللطيف، ثم يضاف 300 ميكرولتر من الإيتانول المطلق المبرد بالدرجة -20 م°، و توضع العينة في المجمدة لمدة 10 دقائق. يؤدي الإيتانول لغسل الدنا و إعادة ترسيبها بشكل أنقى.
- تثفل العينة بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، مما يؤدي إلى تجمع الدنا المترسب في قعر الأنبوب.
- نفتح الأنبوب ونرمي الطور السائل بالكامل بلطف و حذر حتى لا نفقد رسابة الدنا.
- يترك الأنبوب على الطاولة مفتوحاً حتى تطاير الكحول و جفاف الدنا بشكل كامل.
- يمكن حفظ الدنا بشكلها المرسب و الجاف في المجمدة (-20 م°) أو حلها في 50 ميكرولتر من الماء الخالي من النكلياز ثم وضعها في المجمدة.

ثانياً- عزل الدنا بطريقة أعمدة كروماتوغرافيا الألفة *Affinity chromatography*:



- تتميز هذه الطريقة:

1- بالسرعة والدقة حيث لا تستغرق عملية العزل أكثر من 30-45 دقيقة.

2- نحصل على دنا أكثر نقاوة وبنوعية أفضل

3- إلا أن التكلفة أكثر من طريقة الترسيب السابقة.

- مبدأ الأعمدة: أعمدة ألفة تحوي فلاتر خاصة من السليكا معالجة ومشحونة إيجابا لترتبط بألفة عالية جزيئات الدنا سالبة الشحنة.

سنستخدم في هذه الجلسة كيت GF-1 من إنتاج شركة Vivantis

يتضمن الكيت الأعمدة وأنابيب للجمع ووقاءات الغسيل wash buffers ووقاءات التمليص Elution buffers اللازمة.



طريقة العزل: (يوضحها المخطط في الأسفل)

ملاحظة يكتب اسم صاحب العينة على كل الأنابيب في كل مراحل العزل منعا لاختلاط العينات.

1- خذ 100 مكرولتر دم في انبوب واضف لها 100 مكرولتر وقاء حل الخلايا buffer BB ورج الانبوب بلطف، أضف 10 مكرولتر من محلول بروتياز، ورج الانبوب بلطف ثانية.واحضن في حمام مائي في الدرجة 65 م لمدة 10 دقائق.

2- أضف 100 مكرولتر إيتانول مطلق و امزج بلطف ، ثم حمل المزيج على العمود المركب على أنبوب الجمع.

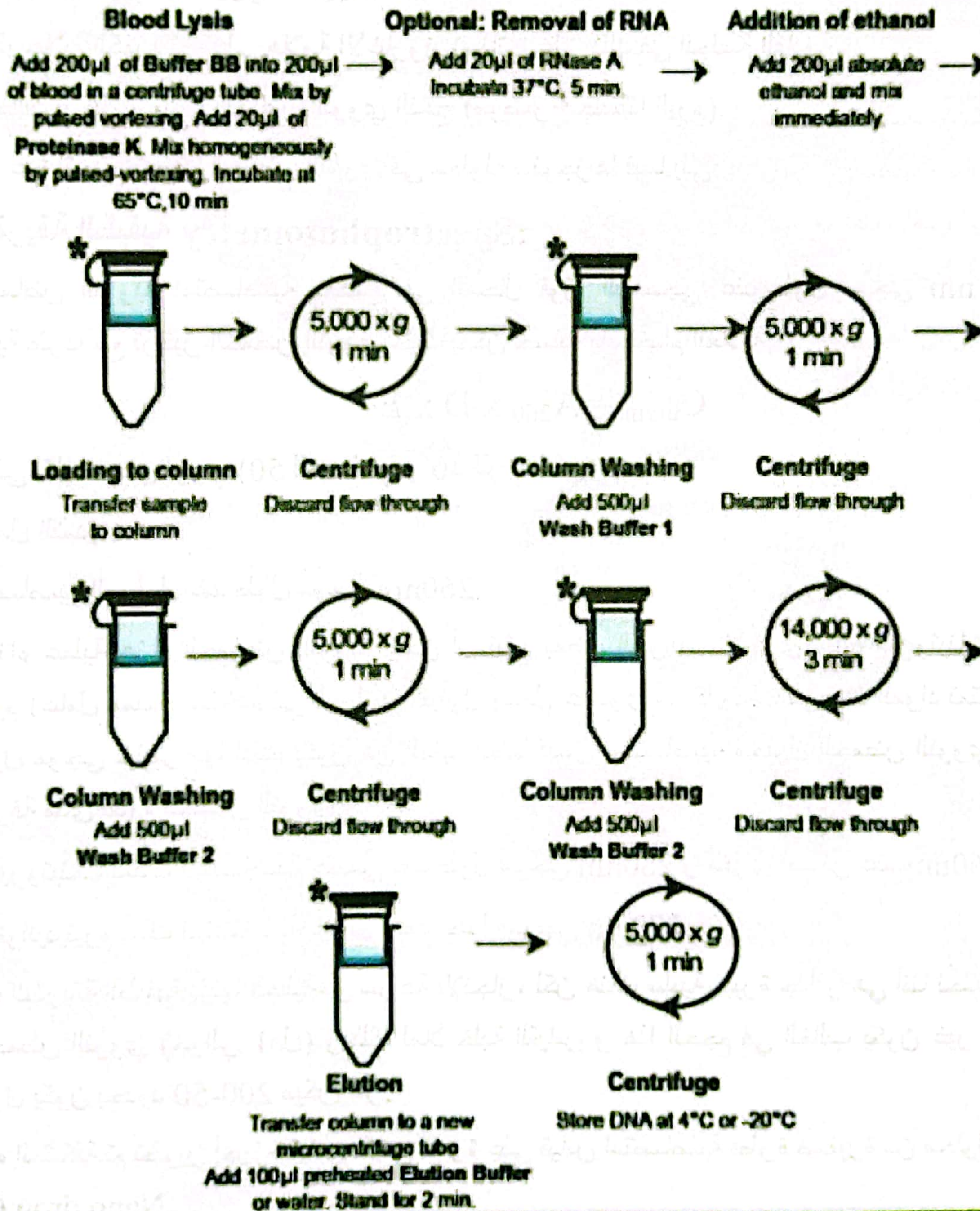
3- ثفل بسرعة 5000 g لمدة 1 دقيقة، وارمي السوائل الخارجة من العمود flow through

4- أضف 250 مكرولتر من وقاء الغسيل الأول wash buffer1 ثم ثفل بسرعة 5000 g لمدة 1 دقيقة، وارمي السوائل الخارجة من العمود.

5- أضف 250 مكرولتر من وقاء الغسيل الثاني wash buffer2 ثم ثفل بأقصى سرعة لمدة 3 دقيقة للتخلص من كل السوائل وتجفيف العمود، ارمي السوائل الخارجة من العمود.

6- انقل العمود إلى أنبوب (Eppendorf) 1,5 مل. وأضف 50 مكرولتر من وقاء التمليص الدافئ وانتظر 2 دقيقة.

7- ثفل بسرعة 5000 g لمدة 1 دقيقة، ثم ارفع العمود وأغلق الانبوب الحاوي الآن على دنا نقية، واحفظه في التجميد.



الجلسة العملية الثانية

التحديد الكمي للأحماض النووية

مقدمة:

بعد أن يتم عزل الأحماض النووية وفق البروتوكولات المبينة في بحث الأحماض النووية ، ينبغي التأكد من فعالية عملية العزل وذلك بتحليل الحمض النووي المعزول:

1- نوعياً بالرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز (سنأتي على ذلك في الجلسة القادمة).

2 - كمياً بتحديد تركيز محلول الحمض النووي الناتج (موضوع جلستنا اليوم).

هناك طرق عدة لتحديد تركيز الحمض النووي في محلوله سنوجزها فيما يلي:

1- الطريقة الطيفية Spectrophotometry:

تمتلك الأحماض النووية امتصاصية عظمى في المجال فوق البنفسجي عند طول موجي 260 nm ، و تتناسب الامتصاصية طردا مع تركيز الحمض النووي حيث يمكن حسابه باستخدام العلاقة:

$$C_{\mu g/ml} = A_{260} \times D \times E$$

E: معطى لكل حمض نووي (50 للدنا النقي و 40 للرنا النقي)

D: معامل التمديد.

A_{260}: امتصاصية المحلول عند طول موجي 260nm.

وبما أنه أثناء عملية عزل الحموض النووية يمكن أن تنتج بعض الشوائب الأخرى مثل: البروتينات (من حل الخلايا)، الغوانيدينيوم (عامل ممسخ يستخدم في العزل)، الفينول (محل عضوي) و كل مادة من هذه المواد تمتلك أيضاً امتصاصية عظمى طول موجي خاص بها لذلك يكون من المفيد أيضاً قياس امتصاصية محلول الحمض النووي عند أطوال موجية أخرى لمعرفة مدى نقاوة الحمض النووي:

- فالبروتينات تمتلك امتصاصية عظمى عند طول موجي 280nm و أخرى أصغر عند 260nm.
- الغوانيدينيوم يملك امتصاصية عظمى عند طول موجي 270nm.

من ميزات الطريقة الطيفية دقتها العالية، و سرعة الإنجاز، لكن هناك سلبية كبيرة جداً و هي أننا نحتاج إلى حجم كبير من محلول الحمض النووي (حوالي 1مل) و ذلك لملأ خلية القياس و هذا الحجم في الغالب يكون غير متاح لنا لأن مردود عملية العزل يكون بحدود 50-200 ميكرولتر.

و لحل هذه المشكلة تم تطوير أجهزة قياس طيفي قادرة على قياس امتصاصية قطرة صغيرة من محلول مجهول (حوالي 5 ميكرولتر) Nano drop.

2- قياس طيف الفلورة:

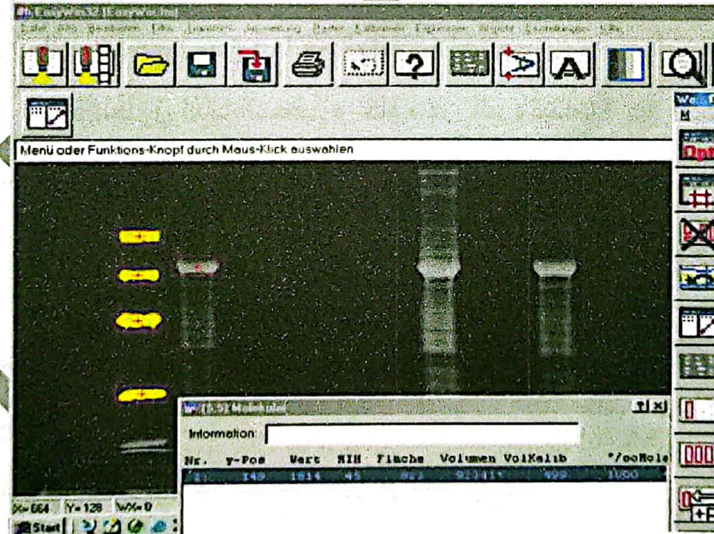
تعتمد عل إضافة مواد صباغية متألقة وفي مثل الـ SYBR® Green الذي يتوضع بين الأسس الآزوتية للحمض النووي، وعند التحفيز يصدر ضوءاً يلتقطه الجهاز امتصاصية خاص، حيث تتناسب شدة التألق طرداً مع تركيز الحمض النووي

يتميز صباغ SYBR® Green بكونه رخيصاً نسبياً وسهل الاستعمال ويعطي حساسية جيدة، ولكن هذا الصباغ التألقي يرتبط حصراً مع الدنا مضاعف السلسلة، و بالتالي لا يمكن استخدامه في حالة محاليل الرنا أو الدنا وحيد السلسلة.

3- باستخدام برامج حاسوبية:

حيث يتم في البداية عمل رحلان كهربائي على الأغاروز لحجم معلوم من عينة الدنا المطلوب تحديد تركيزها، و يحمل على نفس الهلامة حجم محدد من سلم دنا أو محلول دنا معروف التركيز، و بعد انتهاء الرحلان و تلوين و إظهار الصورة ، تصور بكاميرا رقمية خاصة و تنقل الصورة إلى الحاسب، حيث يقوم البرنامج الخاص بتحديد مساحة عصابة الدنا المجهولة و سطوعها ومقارنتها مع مساحة وسطوع عصابة الدنا للعينة الشاهدة (معروفة التركيز) ليقوم بعد ذلك بحساب تركيز الدنا في العينة المجهولة.

تحتاج هذه الطريقة لزمن أطول منه في حالة التحليل الطيفي، و خطأ نسبي حوالي 10% ، إلا أنها لا تستهلك من محلول الدنا سوى ميكرولترات قليلة لذلك تعتبر جيدة في حالات العينات الصغيرة.



التجهيزات و الأدوات المخبرية:

- مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer
- خلايا ضوئية من الكوارتز Quartz cuvette
- ماصات ميكروية Micro pipettes و رؤوس متعددة المقاسات tips
- أنابيب تمديد

المواد و المحاليل اللازمة:

محلول دنا مجهول التركيز، ماء خالي من النكلياز.

طريقة العمل:

المهمة الأولى: تحديد تركيز محلول الدنا المعطى بالطريقة الطيفية.

- يشغل مقياس الطيف و يضبط على طول موجي 260nm.
- تملأ خلية الكوارتز بـ 1مل ماء خالي من النكلياز (يستخدم كمحلول ناصع blank) لتصفير الجهاز.
- تؤخذ خلية كوارتز أخرى جافة و نظيفة و يوضع فيها 1مل من محلول الدنا المجهول و تقاس امتصاصيته A_{260}.
- يجب أن تكون قيمة الامتصاصية في المجال الخطي للقياس (0.2-0.9) و إلا يجب تمديد المحلول بنسبة معروفة D و إعادة القياس.
- يحسب تركيز محلول الدنا المجهول من العلاقة المذكورة أعلاه.

المهمة الثانية: معرفة مدى نقاوة محلول الدنا المعطى و خلوه من البروتينات.

- يضبط مقياس الطيف على طول موجي 280nm.
- تملأ خلية الكوارتز بـ 1مل ماء خالي من النكلياز (يستخدم كمحلول ناصع blank) لتصفير الجهاز.
- تؤخذ خلية كوارتز أخرى جافة و نظيفة و يوضع فيها 1مل من محلول الدنا المجهول (نستخدم نفس التمديد السابق و الذي أعطى امتصاصية في المجال الخطي للقياس) و تقاس امتصاصيته A_{280}.
- تحسب النسبة: A_{260} / A_{280}
- يكون محلول الدنا نقياً إذا كانت النسبة السابقة أكبر أو تساوي 2.

الجلسة العملية الثالثة

الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز

مقدمة نظرية

تشكل وحدات الفوسفات والسكر العمود الفقري لكل من طاقي الدنا في الحلزون المضاعف، وهي تعطي جزيء الدنا ككل شحنة سالبة قوية. وهكذا يمكن القول إن جزيء الدنا هو جزيء مشحون بدرجة عالية، وبالطبع فإن الشحنة السالبة لقطعة صغيرة من الدنا تكون أقل من الشحنة السالبة لقطعة دنا كبيرة لأن الأخيرة تحوي عدداً أكبر من وحدات الفوسفات. ومن ثم عند تطبيق تيار كهربائي على عينة فيها مزيج من قطع دنا كبيرة وصغيرة موجودة في محلول ستتجه كلها إلى القطب الموجب بالسرعة نفسها حيث أن الإعاقة الناتجة من الاحتكاك تكون مهملة في المحلول.

بناء على ما سبق يمكننا فصل قطع الدنا الكبيرة عن الصغيرة من خلال زيادة مقدار الإعاقة الناتجة من الاحتكاك بحيث إن جزيئات الدنا الأصغر تتوجه بسرعة أكبر إلى القطب الموجب بحكم تعرضها لقدر أقل من الإعاقة مقارنة من بجزيئات الدنا الأكبر. ومن هنا تتأتى وظيفة الهلام الذي يقدم الإعاقة اللازمة لفصل جزيئات الدنا بحسب أطوالها، ولهذا نقوم بترحيل قطع الدنا تلك خلال الهلام بهدف فصلها عن بعضها. وسنأتي فيما يأتي على ذكر الرحلان الكهربائي على هلام الأغاروز .

مبدأ الرحلان:

الأغاروز مادة مصدرها الأساسي أشنيات بحرية، تعطي عند غليها بالماء ثم تبريدها كتلة هلامية نصف صلبة مكونة من شبكة بوليميرية، تتعلق أبعاد مساماتها بتركيز الأغاروز المستخدم فكلما ارتفع التركيز انخفض عدد وحجم المسام أي تصبح مناسبة أكثر لفصل الجزيئات الصغيرة والعكس بالعكس.

تتعلق سرعة رحلان جزيئات الدنا على هلامة الأغاروز بوزنها الجزيئي وشدة الحقل الكهربائي المطبق و تركيز الأغاروز حيث : تتناسب سرعة الرحلان طردا مع شدة الحقل الكهربائي و عكساً مع كل من الوزن الجزيئي و تركيز الأغاروز.

يتم إظهار الـ دنا باستخدام ملونات متفلورة تعطي تألقاً عند تعريضها لأشعة الـ UV، من الملونات المستخدمة نذكر: بروميد الإثيديوم و هو سام و مطفر، و Sybr Green و هو أكثر أمناً لكنه يتألق فقط عند ارتباطه مع جزيئات الدنا مضاعف الطاق.

تجهيزات و الأدوات المخبرية:

- حوض رحلان كهربائي
- جهاز مولد جهد كهربائي (قابل للضبط)
- ملحقات: صواني Trays لصب الهلام ، أمشاط combs لتشكيل آبار wells للعينات .

- جهاز ميكروويف أو سخان.
- أدوات زجاجية: أرلنماير، مقياس مدرج..

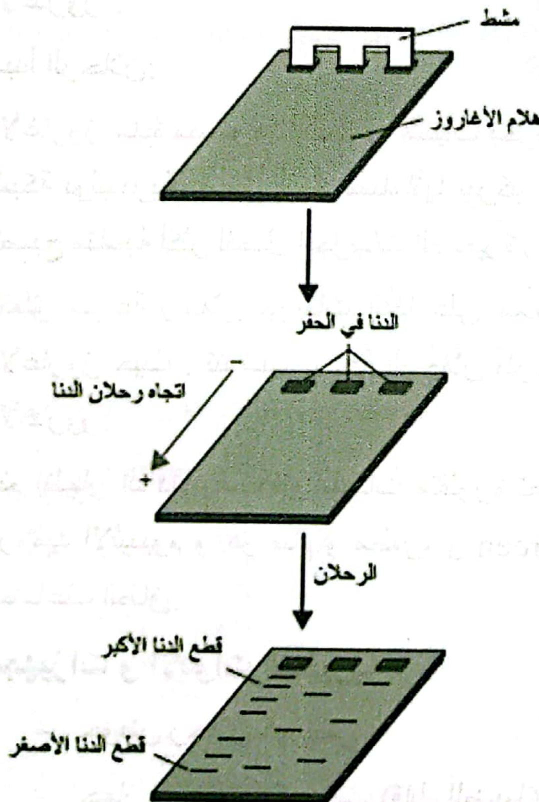
المواد و المحاليل اللازمة:

- وقاء ترحيل TAE (1x).
- Agarose
- سلم دنا 1kbp DNA ladder
- مزيج صباغي لتحميل العينات 6x loading dye
- صباغ مفلور Ethedium bromide (يرجى الحذر: له قدرة مولدة للطفرات) يجب ارتداء قفازات خاصة مصنوعة من مادة النتريل (زرقاء اللون) عند التعامل مع هذه المادة و الهلامات و الأدوات الحاوية عليها.

طريقة العمل:

1. تحضير هلامة الآغاروز (1%):

- يوزن مقدار 1غ من الآغاروز و توضع في أرلنماير جاف و نظيف، ثم يضاف له 100 مل من وقاء الرحلان((TAE (1x).



- يسخن المزيج في الميكروويف لمدة 2دقيقة، او على سخان كهربائي، مع التحريك حتى الإنحلال الكامل للآغاروز (يصبح المزيج سائل كثيف متجانس)
- يضاف للمزيج الساخن 7 ميكرولتر من محلول بروميد الإتيديوم مع المزج اللطيف حتى التجانس.

2. صب الهلامة:

- تحضر صواني الصب بوضعها على الحوامل المخصصة لذلك و تثبيت الأمشاط combs عليها. توجد قياسات عدة للأمشاط تختلف عن بعضها بعدد أحجام اللآبار wells التي تولدها.
- تصب الهلامة بلطف في الزاوية البعيدة عن المشط، مع تجنب توليد فقاعات هوائية في الهلامة لأنها تجعل الرحلان غير متجانس.
- تترك الهلامة في درجة الغرفة لمدة 15 دقيقة حتى التصلب التام، حيث يصبح قوامها جيلاتيني كثيف و لونها حليبي.

3. التحضير للرحلان:

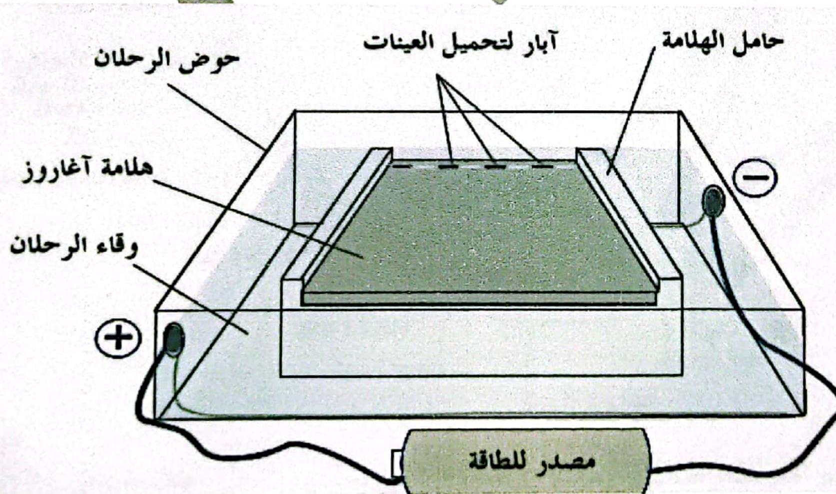
- بعد تصلب الهلام ترفع الصواني الحاملة للهلام و توضع في حوض الرحلان بحيث يكون المشط من جهة القطب السالب.
- يملأ حوض الترحيل بوقاء الـ TAE 1x بلطف حتى يعلو الوقاء سطح الهلام بارتفاع حوالي 1سم.
- ينزع المشط بهدوء و حذر حتى لا تتخرب الآبار المتشكلة، بعد نزع المشط يملأ وقاء الترحيل الآبار مما يحافظ عليها و يمنع التصاق حوافها.

4. تحميل العينات:

- تحضر عينات الدنا بمزج 5ميكرولتر من العينة مع 1 ميكرولتر من صباغ التحميل 6xloading dye (1:5).
- تحمل العينة في إحدى آبار الهلامة باستخدام ماصة مكروية micro piptte، باستخدام رؤوس tips صغيرة (قياس 1-10 ميكرولتر).
- يحمل 5 ميكرولترمن سلم الدنا في إحدى الآبار الفارغة . (يكون سلم الدنا عادة ممزوجاً مسبقاً مع صباغ التحميل).

5. بدء الرحلان:

- يوضع غطاء حوض الرحلان و توصل المساري إلى مولد الجهد (بحيث يكون القطب السالب من طرف عينات الدنا).
- تضبط شدة الحقل الكهربائي على($5\ v.cm^{-1}$) و هو مايوافق 100 فولت في حالة الجهاز المتوفر لدينا.
- يضغط زر البدء و ننتظر حتى يكتمل الترحيل.



6. انتهاء الرحلان:

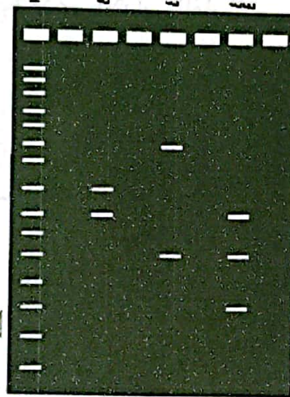
يمكن متابعة تقدم عملية الرحلان بالعين المجردة و ذلك بمساعدة صباغ التحميل، حيث أنه مكون من مزيج من عدة مواد صباغية تترحل على الهلام بسرعات مختلفة ففي حالة صبغة 6× loading dye من إنتاج شركة FERMENTASE تضم عادة ملونين هما xylene cyan (يسلك سلوك دنا حجمه 4000bp) و Bromophenole blue (يسلك سلوك دنا حجمه حوالي 400bp).

نترك الرحلان يعمل حتى وصول عصابات ملون أزرق البروموفنول إلى قرب نهاية الهلام، عندها يتم فصل التيار الكهربائي، فتح غطاء حوض الترحيل و رفع الصواني الحاملة للهلام و تصفية وقاء الترحيل بحذر حتى لايقع الهلام.

7. إظهار عصابات الدنا:

توضع الهلامة في حجرة الـ UV مما يودي إلى تألق عصابات الدنا (لاصطباغها ببروميد الإثيديوم) و يمكن رؤيتها بالعين المجردة.

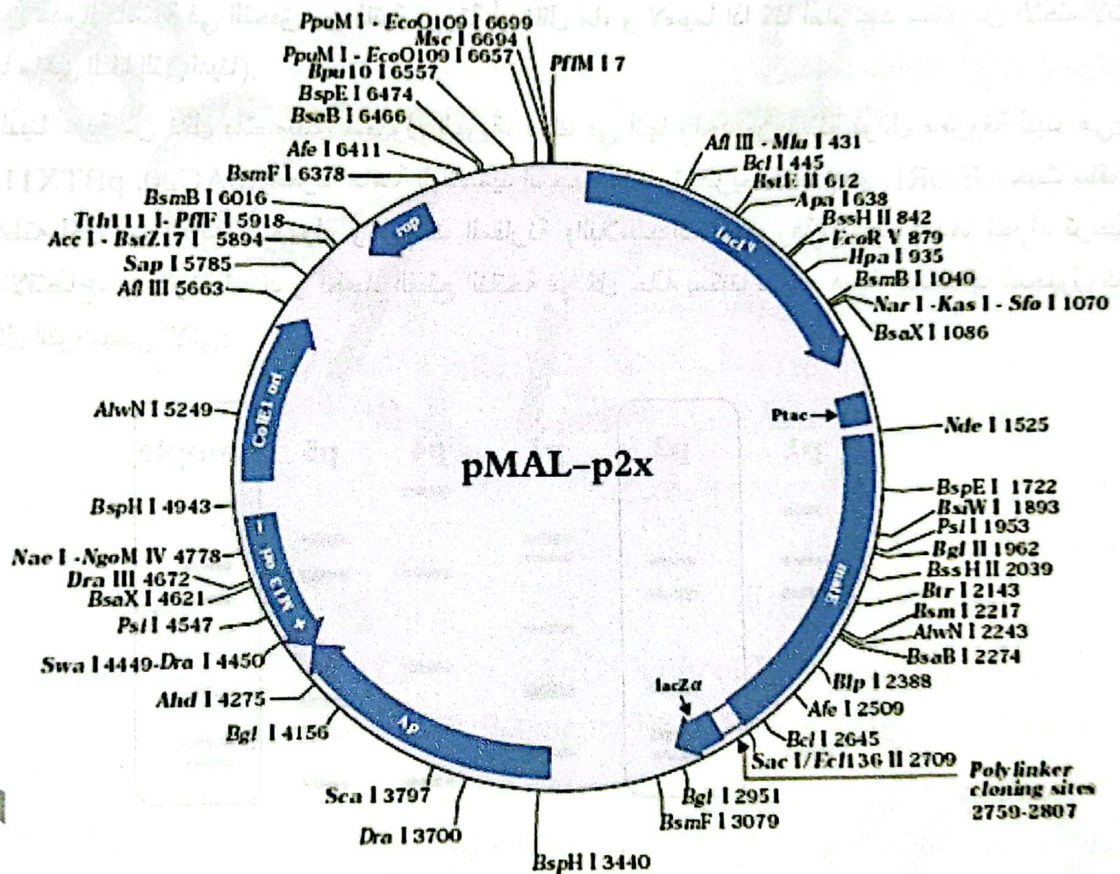
يمكن تصوير الهلامة باستخدام كاميرا رقمية متصلة بجهاز حاسب يحمل برنامج لتوثيق و معالجة صور الرحلان الكهربائي Gel documentation system .



الجلستين الرابعة و الخامسة
خرائط الاقتطاع للدنا
Restriction maps

مقدمة

هي مخططات تبين قسم من شريط الدنا (جينومي، بلاسميديي، مورثة معينة....) و عليه مواقع قطع لإنزيم اقتطاع واحد أو أكثر كما هو مبين في المثال الآتي:



يوضح الشكل كل مواقع التعرف لإنزيمات الاقتطاع التي يملكها الناقل البلاسميدي pMAL-p2x

وتكمن الخطوة الأولى لإنشاء مثل هذه الخرائط في اقتطاع الدنا بمجموعة من إنزيمات الاقتطاع كل واحد على حده، ومن ثم تفصل قطع الدنا الناتجة بوساطة الرحلان الكهربائي على الهلام ويتم تحديد أطوال قطع الدنا الناتجة من خلال مقارنتها مع عياري مؤلف من قطع دنا بأطوال معروفة .

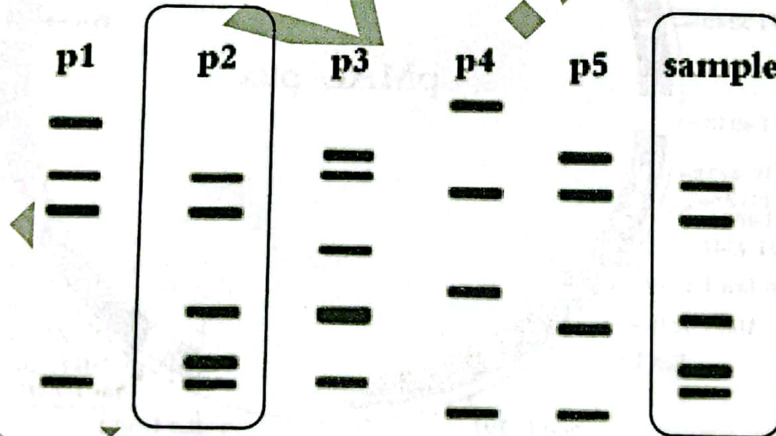
لمعرفة الترتيب الحقيقي لهذه القطع لا بد من إجراء قطع الدنا بإنزيمي اقتطاع في آنٍ وهو ما يسمى بالاقتطاع المضاعف Double digest، ومن ثم مقارنة نواتج الاقتطاع المضاعف مع القطع التي تنتج من قطع الدنا بكل إنزيم على حده (انظر المحاضرة النظرية الخامسة).

استخدام خرائط الاقتطاع في التحقق من ذاتية للدنا:

بما أن كل مورثة أو ناقل بلاسميدي تملك تسلسلاً محدداً، فتكون مواقع التعرف لإنزيمات الاقتطاع ثابتة فيها دوماً (مالم تطرأ عليها طفرة ما)، و بالتالي فإن المعالجة بإنزيم اقتطاع معين سوف يعطي نفس نموذج الاقتطاع دوماً restiction pattern (أي نفس عدد القطع و بنفس الأحجام).

يمكن الاستفادة من هذه الخاصية في التحقق من ذاتية مورثة أو ناقل ما، و لاسيما إذا كنا أمام عدد محدد من الاحتمالات (أي نعرف تقريباً ماهي الدنا التي لدينا).

في هذه الجلسة لدينا عينة من ناقل بلاسميدي مجهول الهوية، نشك في أنها واحد من ثلاثة نواقل معروفة لدينا هي: pAC20, pBTX117, pGAP420. لمعرفة ماهية البلاسميد المجهول اخترنا إنزيم اقتطاع هو *Eco*RI ، حيث سنقوم بعمل قطع بوساطته لكل من العينة المجهولة و عينات المقارنة (البلاسميدات المعروفة)، سيتم بعدها إجراء ترحيل كهربائي لنواتج الاقتطاع، وبمقارنة أعداد و أحجام القطع الناتجة في كل حالة يمكننا تحديد هوية البلاسميد المجهول كما هو مبين في الشكل التوضيحي الآتي:

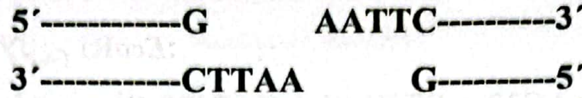


إنزيم *Eco*RI:

من إنزيمات القطع المحددة restriction enzymes ، عزل من جراثيم الإيشيريشيا الكولونية من السلالة RY13، وهو مرمّز على المورثة *ecoRIR* من جينوم الجرثوم.

يتعرف الإنزيم على التسلسل GAATTC من الدنا المستهدف و يقوم بقطعه بين الادينوزين و الغوانوزين، و ينتج عن القطع نهايات تماسكية sticky ends ، سائبة من الطرف 5´ .

د. محمد ياسر عبجي
2022-2021



درجة الحرارة المفضلة لعمل إنزيم *Eco*RI هي 37ºC ، و للتخلص من الإنزيم و تمسيخه عندما نرغب بوقف تفاعل القطع نقوم برفع درجة حرارة الوسط إلى 65ºC لمدة 15 دقيقة.

تقاس كمية الإنزيم بالوحدات الدولية IU حيث **تعرف الوحدة الدولية**: بأنها كمية الإنزيم اللازمة لقطع 1 مكغ من λDNA موجودة في حجم مقداره 50 ميكرولتر من وقاء محدد ، خلال ساعة واحدة، في الدرجة 37ºC.

التجهيزات و الأدوات المخبرية:

- حمام مائي
- ماصات ميكروبية مع رؤوس، أنابيب 1.5 مل مع غطاء.
- حوض رحلان كهربائي
- جهاز مولد جهد كهربائي (قابل للضبط)
- ملحقات: صواني Trays لصب الهلام، أمشاط combs لتشكيل آبار wells للعينات .
- جهاز ميكروويف أو سخان.
- أدوات زجاجية: أرلنماير، مقياس مدرج..

المواد و المحاليل اللازمة:

- إنزيم *Eco*RI (10IU/µl)
- وقاء قطع خاص بإنزيم *Eco*RII; (10X) مكون من: (10mM tris.cl, 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,2 mg/ml BSA, 50% glycerine, pH 7.4)
- ماء خالي النكلياز
- بلاسميدات نقية: pAC20, pBTX117, pGAP420 .
- عينة بلاسميد مجهولة
- مستلزمات الرحلان الكهربائي (كما في الجلسة الثالثة).

طريقة العمل

أولاً: قطع الدنا البلاسميدي بالإنزيم *Eco*RI:

يتم قطع كل من عينات البلاسميدات المعطاة pAC20, pBTX117, pGAP420 و عينة البلاسميد المجهول وفق البروتوكول التالي:

- يوضع 12 ميكرولتر من الماء خالي النكلياز في أنبوب (1.5 مل) و يضاف له 2 ميكرولتر من الوقاء (10X) و 5 ميكرولتر من عينة الدنا البلاسميدي و نمزج جيداً بالماصة المكروية (سحب و تفريغ).
- يضاف 1 ميكرولتر من الإنزيم *Eco*RI و نمزج جيداً بالماصة.
- يغلق الأنبوب بإحكام ثم يثفل الأنبوب لثواني معدودة.
- تحضن أنابيب العينات في الحمام المائي بالدرجة 37ºC لمدة 30 دقيقة لإتمام عملية الاقتطاع.
- ترفع حرارة الحمام المائي إلى الدرجة 65ºC و يترك لمدة 15 دقيقة لإيقاف تفاعل الاقتطاع.

ثانياً. ترحيل عينات البلاسميد المقطوعة على هلامة الآغاروز:

- يضاف لكل عينة من عينات البلاسميدات المقطوعة 5 ميكرولتر من صباغ التحميل 6xLoading dye.
- تحضر100 مل من هلامة آغاروز بتركيز 1.5% (كما هو مبين في الجلسة الثالثة).
- تصب الهلامة و يوضع مشط ذو أسنان كبيرة (تتسع لعينات حجم 25 ميكرولتر) و تترك الهلامة لتتصلب.
- ينزع المشط و توضع الهلامة في حوض الرحلان و تغمر بوقاء الترحيل (TAE 1x).
- تحمل كامل العينات المقطوعة على هلامة الأغاروز (pAC20, pBTX117, pGAP420 بالإضافة لعينة البلاسميد المجهولة.)
- ترحل العينات في حقل كهربائي (100فولت) حتى وصول جبهة الملون الأزرق (بروموفينول) إلى مسافة 2 سم من حافة الهلامة.
- يوقف الرحلان و تنقل الهلامة إلى جهاز الـ UV لإظهار الحزم، و نعمل صورة للهلامة.

تقييم النتائج:

ترسم نماذج الاقتطاع لكل العينات على تقرير الجلسة، نقارن نماذج الاقتطاع و نحدد هوية عينة الدنا المجهولة.

د. محمد ياسر عبجي
2022-2021

الجلسة السادسة

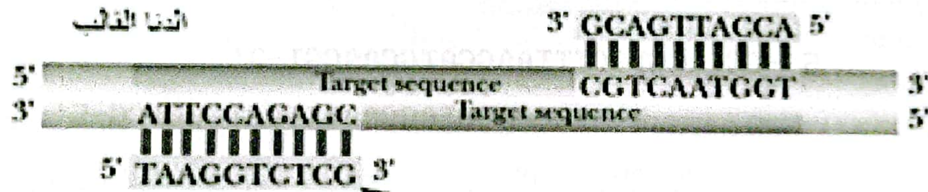
تصميم البوادئ Primers design

مقدمة نظرية:

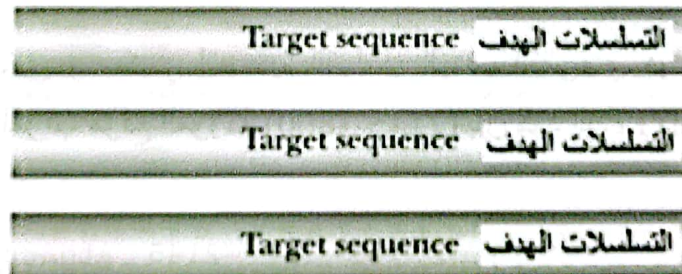
أولاً: البوادئ Primer:

ذكرنا سابقاً أن الـ PCR تحتاج لبوادئ، وهذا يعني أنه يجب أن تتوفر لدينا بعض المعلومات عن تسلسلات الدنا في القالب. لتضخيم التسلسل الهدف الموجود على قالب دنا معين يلزمنا عادة زوج من البوادئ هما:

1. بادئ أمامي (fw) forward primer يرتبط في بداية التسلسل الهدف المراد target sequence تضخيمه، على الطاق 5′ ← 3′ (الطاق السفلي في الشكل أدناه)، أي أن تسلسل هذا البادئ يكون مماثلاً لبداية الطاق العلوي 5′ ← 3′.
2. بادئ عكسي (rev) reverse primer يرتبط في نهاية التسلسل الهدف المراد تضخيمه على الطاق 3′ ← 5′ (الطاق العلوي في الشكل أدناه)، أي أن تسلسل هذا البادئ يكون متمماً لنهاية الطاق العلوي 3′ ← 5′ .



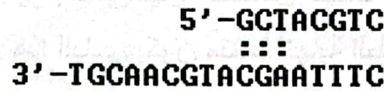
تفاعل (PCR)



نسخ عديدة من التسلسلات الهدف

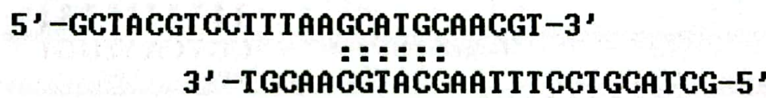
يعتمد نجاح عملية الـ PCR لدرجة كبيرة على البوادئ ، وفيما يأتي نورد الخصائص الرئيسة التي يجب أن تتمتع بها البوادئ لتقوم بعملها على الوجه الأكمل:

1. أن يتراوح طولها بين 17-٣٠ نيكليوتيد بما يكفي لجعلها انتقائية بحيث ترتبط على موقع واحد فريد Unique ضمن الجينوم، وهو الموقع الهدف دون غيره.
2. أن تحتوي من نيكليوتيدات (G + C) ما يقارب الـ ٥٠%.
3. أن تكون درجات حرارة الارتباط T_m للبوادئ التي سوف تستخدم في تفاعل واحد متقاربة جداً أو متساوية.
4. أن لا توجد تسلسلات تكرارية Runs ضمن البوادئ لمنع ارتباط هذه الأخيرة مع التسلسلات التكرارية الموجودة في الجينوم.
5. أن لا يحتوي كل بادئ على حدة على تسلسلات نيكليوتيدية متتامة بداخله، وذلك لأنها تميل للارتباط فيما بينها وتشكل بنية ثانوية تشبه العروة Hairpin بدلاً من أن ترتبط مع الدنا القالب.



```
    5'-GCTACGTC
          :::     >
3'-TGCAACGTACGAATTTC
```

6. أن لا تكون تسلسلات البوادئ متممة لبعضها لأن هذا يفضي إلى تشكل ثنائيات من هذه البوادئ Primer dimer ويمنع تضخيم الدنا الهدف بنجاح.



```
5'-GCTACGTCCTTTAAGCATGCAACGT-3'
                 :::::::
           3'-TGCAACGTACGAATTTCCTGCATCG-5'
```

تجدر الإشارة إلى وجود العديد من البرمجيات على شبكة الإنترنت، والتي تقوم بتصميم مجموعة من البوادئ التي تناسب موقع الدنا الجينومي المراد دراسته، ومن أمثلة هذه البرمجيات primer-blast الموجود على متصفح NCBI، كما يوجد برامج يمكن تنزيلها و العمل عليها دون الحاجة للاتصال بالإنترنت كما هو الحال مع البرنامج Primer designer version 2.0 و الذي ستستخدمه في هذه الجلسة.

ثانياً: التسلسل الهدف

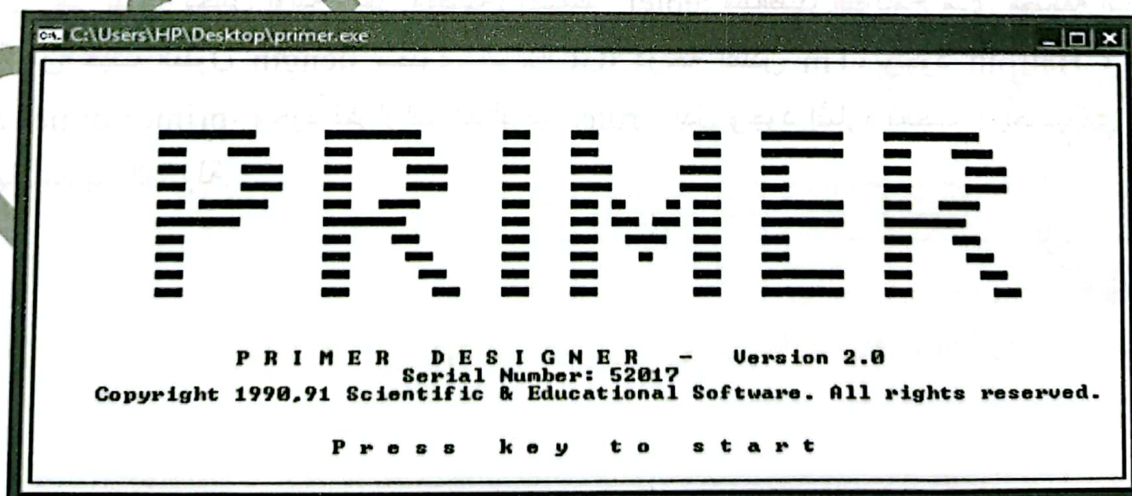
سنحاول تصميم بادئين أمامي و عكسي لتضخيم التسلسل الهدف التالي، و هو عبارة عن مورثة (*orf10*) من دنا بلاسميدي لجراثيم إيجابية الغرام، موقع المورثة (2145-3800) بين كود البدء ATG و كود التوقف TAA

```
                                        2145  atgact  agtttattag  2161
cagaatcaga  cggtttaata  ttggggaaat  ttccaagtgg  aaaagttgtg  atccaacccg  2221
aagatagcaa  aataagcaat  cgaaatattt  ttgtagtagg  tggtccagga  tcatttaaaa  2281
cacaaagtta  tgttttgcct  aatgttgtaa  ataatcgcag  tacgtcaatt  gttgtaaccg  2341
```

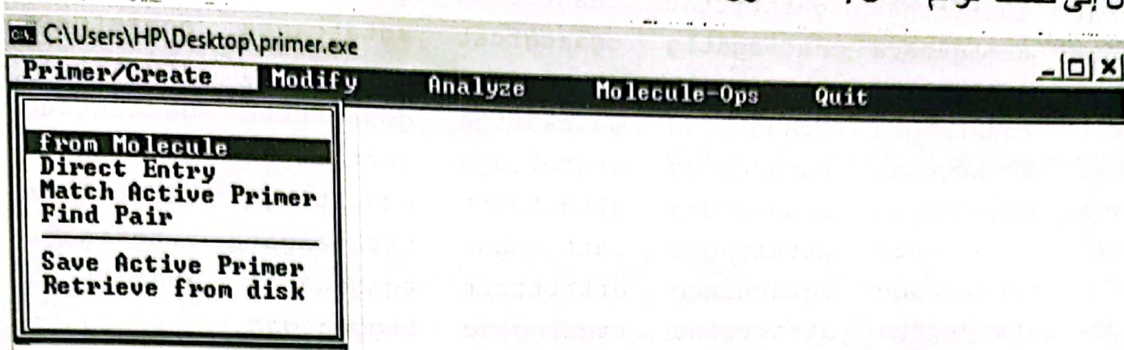
```
atccaaaagg  ggaaatttac  gagttaacca  atgaaataaa  aaaagcccag  ggcttcaaaa  2401
cggttgtcat  aaattttaaa  gatttttac   taagttctag  gtacaatcca  ttactttaca  2461
ttcgcaaatc  aaatgataca  aacaagattg  cgaacgtcat  agtatcagca  aagaatgacc  2521
ccaaacggaa  agattttgg   ttcaatgcac  aattaaactt  attaaatacg  ttgattaaat  2581
atgtttattt  tgaatatgaa  ccaagcgcaa  gaacaattga  gggtatttta  gactttttag  2641
aagaatttga  tccacgctat  aacgaagaag  gtgtatcaga  acttgatgaa  caatttgagc  2701
gtttgccaga  cggacacgaa  gcaaaacgca  gttactattt  aggcttccga  caagcacaaa  2761
gtgaagcaag  accaaacatt  gttattagtc  tattgacgac  tttacaagat  tttgttgata  2821
aagaagtatc  agaatttacc  agtacaaacg  atttttctt   tgaggaatta  ggaacgtcaa  2881
aaatttgttt  atacgtgcta  atttccccat  tagatcgaac  ttgggacggc  ttagtgaatc  2941
tctttttcca  acaaatgttt  acagagttat  atttttagg   ggataagcac  aacgcaaaat  3001
tgccagtacc  tttagttatg  ttactagatg  aatttgtcaa  tttgggctac  tttccaacat  3061
acgagaattt  tcttgcaacg  tgtcgagggt  atcgtatttc  agttagtacc  atattgcaat  3121
ctttgcccca  gggctttgaa  ctttacggag  ataagaaatt  taaagcgatc  attgggaatc  3181
atgccattaa  aatatgtcta  ggtggtgtag  aggaaacgac  cgccgaatac  ttttcaagac  3241
aagtaaatga  tacaacaatc  aaagtatata  caggcggaac  aagtgaaagt  aaaacgtccg  3301
caaaaacaac  taaccgaagc  ggaagtaagt  cagaaagcta  cggttaccaa  aaaaggcgat  3361
tgattaccga  aggggaagtt  atcaatttac  aacaagaaga  aaatggcaga  aaaagtattg  3421
tgttaattga  cggtaaacct  tacatgttaa  gaaaaacgcc  acaatttgaa  ttgttcggaa  3481
atcttcttaa  aaagcatgaa  atttcacagc  aagattatat  aagcagtcaa  acggaatttg  3541
ccaaagaata  cattgaggaa  ttggaaaaac  agcacaaaca  acgaaaagtg  caactagcaa  3601
gcgccccaat  ttttcatgag  aagaaacaag  aagatgattt  gaataaaaaa  gaaataaatc  3661
tacctgaaca  accgatcgaa  tcagaagtaa  cagaagaaga  ggaagaaaaa  gaactatcaa  3721
tgagtgatat  tctaagtagt  tttgatgaag  gtatagagga  aaacacagcc  aacaatgaca  3781
acagcgaatt accattttaa
```

ثالثاً. تشغيل برنامج Primer designer:

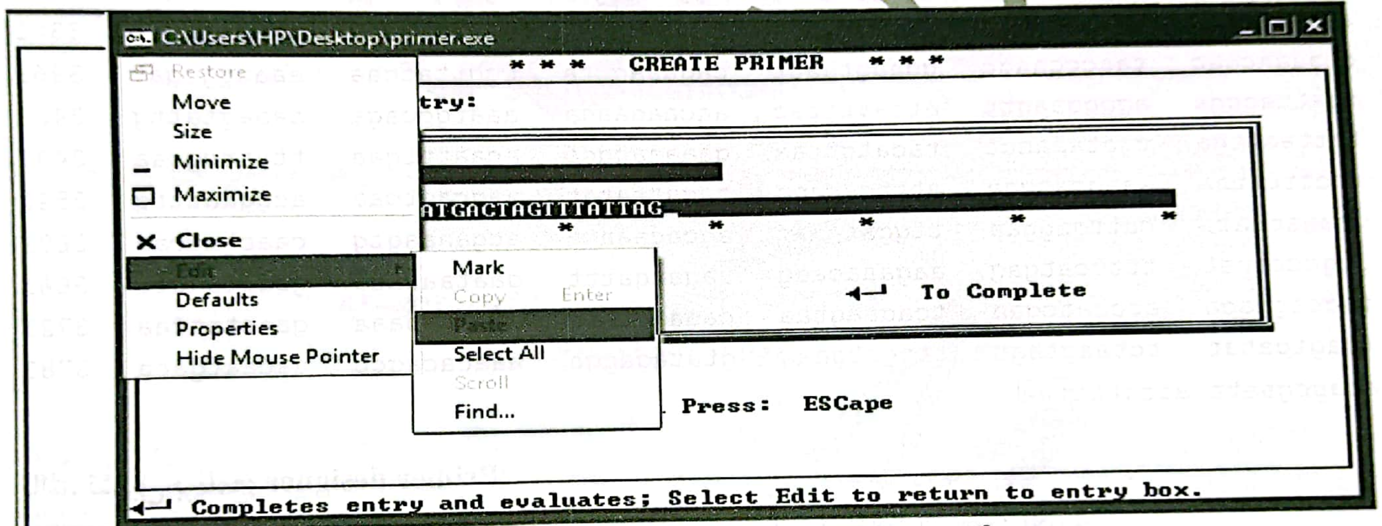
- لتشغيل البرنامج لإضغط أيقونة البرنامج primer.exe ستحصل على نافذة الترحيب الآتية:



- للإنتقال إلى صفحة قوائم العمل إضغط الزر enter، ستشاهد النافذة الآتية:



- اضغط بالماوس على قائمة إنشاء برايمر primer create ثم اختر الأمر direct entry أي إدخال مباشر
- سنقوم الأن بلصق تسلسل البادئ الأمامي (أول 20 نكليوتيد من تسلسل المورثة *orf10*) في المربع المخصص، للقيام باللصق إضغط الزر الصغير في أعلى يسار الشاشة /:C ، ثم اضغط edit ثم paste.



- للحصول على نتيجة تحليل أولية (غير مفصلة) إضغط :enter سيعطينا البرنامج مدى مطابقة البرايمر للمعايير المقبولة من حيث الطول length، محتوى الـ GC%، درجة التلدن Tm، وجود Hairpin ، تشكيل ثنائيات البوادئ primer dimer، وجود تكرارات النكليوتيد runs . يدل وجود إشارة تعجب ! بجانب أي قيمة على عدم مطابقتها للمعايير المقبولة.

```
                    * * *   CREATE PRIMER   * * *

      Direct Entry:

          5' Ext:
          Primer:  ATGACTGTTTATTAGCAGAA
                             *        *        *        *        *
          Press INS to change mode
               INSERT MODE                    ←┘  To Complete

  MEETS CRITERIA SELECTED: NO
  Length: 20   %GC: 30!   Tm°C: 58   Hairpin: OK  Dimers: OK  Runs: !

   C=Criteria     E=Edit     I=Inspect                S=Save+Exit
←┘ Completes entry and evaluates; Select Edit to return to entry box.
```

- لحفظ البادئ و الانتقال لتحليل بادئ ثاني اضغط save ، أما للحصول على تفاصيل أكثر عن نتيجة التحليل فاضغط Inspect ستشاهد النافذة التفصيلية الآتية:

```
                    * * *   PRIMER ANALYSIS   * * *

  Sequence:          5'-ATGACTGTTTATTAGCAGAA-3'
                     Length:  20      5' Ext: --none--
                     Composition:  A:7   C:2   G:4   T:7


  Criteria           Criteria Setting                 Actual   Meets Criteria
  ------------       -----------------------------    ------   --------------
  % GC               Min   50,    Max   60              30          NO
  Tm°C               Min   55,    Max   80              58          YES

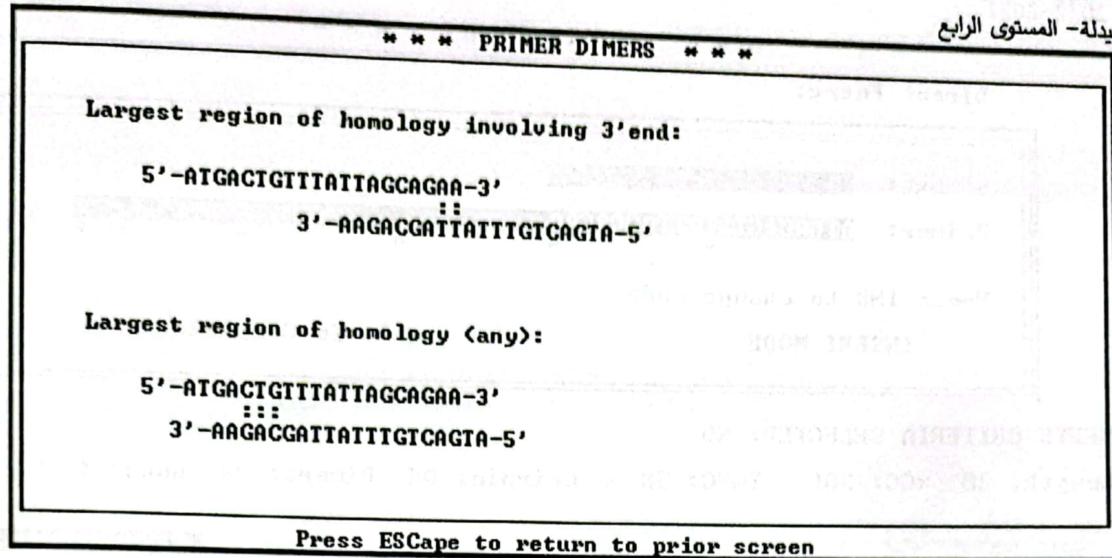
  No Hairpins        Energy cutoff  0.0 kcal            --          YES

  No 3' Dimers       Reject >=  3 matches at 3' end      2          YES
  No Dimers          Reject >=  7 adj homol bases        3          YES

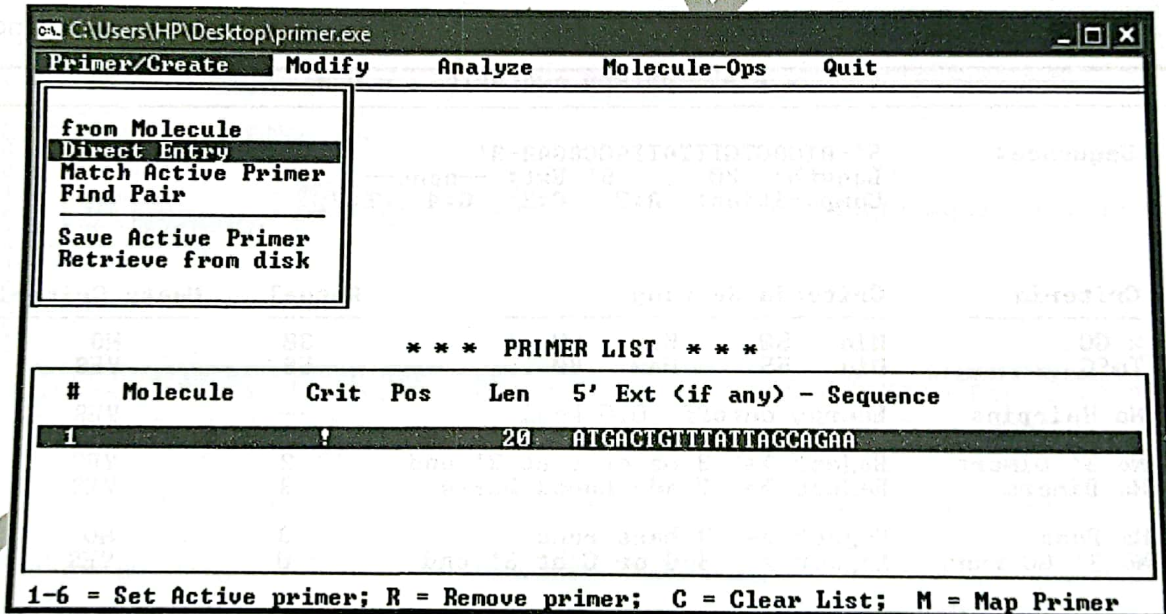
  No Runs            Reject >=  3 base runs              3          NO
  No 3' GC runs      Reject >=  3 G or C at 3' end       0          YES

  U=Unique   F=FalsePri   H=HairPn   D=Dimers   P=Print   ESCape
```

- في أسفل هذه النافذة توجد أزرار تعطي مزيداً من التفاصيل عن نتيجة تحليل البادئ، مثلاً بالضغط على الزر Dimers نشاهد بالتفصيل شكل ثنائيات البوادئ التي يقوم جزيء البادئ ببنائها مع نفسه كما توضح النافذة في الأسفل:



- للرجوع للوراء إضغط escape مرتان ثم اضغط زر save لحفظ نتائج البادئ الأمامي و الانتقال لتحليل البادئ العكسي. سينشئ البرنامج في الأسفل جدولاً للبرايمرات التي تقوم بحفظها Primer list .
- اضغط بالماوس على قائمة إنشاء برايمر primer create ثم اختر الأمر direct entry أي إدخال مباشر



- سنقوم الآن بلصق تسلسل البادئ العكسي (التسلسل المتمم و المعكوس لآخر 20 نكليوتيد من المورثة) ، للقيام باللصق إضغط الزر الصغير في أعلى يسار الشاشة /:C ، ثم اضغط edit ثم paste.
- للحصول على نتيجة تحليل أولية (غير مفصلة) إضغط enter، أما للحصول على تفاصيل أكثر عن نتيجة التحليل فاضغط Inspect

```
C:\Users\HP\Desktop\primer.exe
*** CREATE PRIMER ***
Direct Entry:
5' Ext:
Primer: TTAAAATGGTAATTCGCTGT
Press INS to change mode
INSERT MODE          ↵ To Complete
MEETS CRITERIA SELECTED: NO
Length: 20  %GC: 30!  Tm°C: 64  Hairpin: OK  Dimers: OK  Runs: !
C=Criteria  E=Edit  I=Inspect           S=Save+Exit
↵ Completes entry and evaluates; Select Edit to return to entry box.
```

- اضغط زر save لحفظ نتائج البادئ العكسي، ستشاهد جدولاً في الأسفل يتضمن البوادئ التي قمت بتحليلها و حفظها ، مرتبة و مرقمة تسلسلياً.
- لفحص البادئين الأمامي و العكسي معاً (أي معرفة مدى ملاءمة مشاركتهما معا في تفاعل PCR واحد) اختر قائمة Analyze ثم الأمر Primer pair .

```
C:\Users\HP\Desktop\primer.exe
Primer/Create   Modify   Analyze   Molecule-Ops   Quit
                         Active Primer
                         Primer Pair
                         Multi Primer

*** PRIMER LIST ***
#  Molecule   Crit  Pos  Len  5' Ext (if any) - Sequence
1             !          20   ATGACTGTTTATTAGCAGAA
2             !          20   TTAAAATGGTAATTCGCTGT
1-6 = Set Active primer; R = Remove primer; C = Clear List; M = Map Primer
```

```
C:\Users\HP\Desktop\primer.exe
Primer/Create    Modify    Analyze    Molecule-Ops    Quit

        * * *  PRIMER PAIR ANALYSIS  * * *
  Please enter primer #s (from Active Primer List, below)
  to indicate which two primers to analyze.
        Primer A:
        Primer B:
                              To Cancel Press:  [ ESC ]

              * * *  PRIMER LIST  * * *
 #   Molecule      Crit   Pos    Len    5' Ext (if any) - Sequence
 1                  !             20    ATGACTGTTTATTAGCAGAA
 2                  !             20    TTAAAATGGTAATTCGCTGT

1-6 = Set Active primer; R = Remove primer;  C = Clear List;  M = Map Primer
```

- كما هو مبين في الأعلى عليك اختيار أرقام البادئين A, B الذين ترغب في فحصهما ، في حالتنا هذه 1و 2.
- ستحصل مباشرة على جدول يوضح نتيجة تحليل زوج البادئين A, B

```
C:\Users\HP\Desktop\primer.exe
              * * *  PRIMER PAIR ANALYSIS  * * *

  Primer A (bp     1 ):  5'-ATGACTGTTTATTAGCAGAA-3'
  Primer B (bp     1 ):  5'-TTAAAATGGTAATTCGCTGT-3'

  Primer Balance:                  -A-      -B-     Comment
    Length                          20       20
    % GC                            30!      30!
    Tm°C                            58       64     6°C difference

  Primer Cautions:
    Runs of G/C at 3' end            0        0
    Runs of bases (any)              3        4!    Runs found
    Hairpins                        OK       OK

  Primer Dimers:                   A:A      B:B     A:B
    3' end matches                   2        1      3!
    Any adj homol bases              3        4      4

  A=AnalProd   H=HairPn   D=Dimers   P=Print   ESCape
```

الجلسة السابعة

تعريف ببنوك الدنا ورسم الخرائط الوراثية

DNA data banks بنوك الدنا

NCBI Entrez Nucleotide

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC

Search CoreNucleotide Go Clear

Limits Preview/Index History Clipboard

Display GenBank Show 5 Send to Hide features

Range: from begin to end Features: + Refresh

1: AX377531. Reports Sequence 8 from P..[gi:19573717]

Features Sequence

```
LOCUS       AX377531                6648 bp    DNA     linear   PAT 18-MAR-2002
DEFINITION  Sequence 8 from Patent WO0212553.
ACCESSION   AX377531
VERSION     AX377531.1  GI:19573717
KEYWORDS    .
SOURCE      synthetic construct
  ORGANISM  synthetic construct
            other sequences; artificial sequences.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Kappel,A., Polakowski,T., Pignot,M., Windhab,N., Behrensdorf,H. and
            Muth,J.
  TITLE     Method for detecting mutations in nucleotide sequences
  JOURNAL   Patent: WO 0212553-A 8 14-FEB-2002;
            Nanogen Recognomics GmbH (DE)
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..6648
                     /organism="synthetic construct"
                     /mol_type="unassigned DNA"
                     /db_xref="taxon:32630"
                     /note="Plasmid pMAL-c2x"
ORIGIN
        1 ccgacaccat cgaatggtgc aaaacctttc gcggtatggc atgatagcgc ccggaagaga
       61 gtcaattcag ggtggtgaat gtgaaaccag taacgttata cgatgtcgca gagtatgccg
```

Annotations: LOCUS — الموقع و طول الدنا; DEFINITION — رقم براءة الاكتشاف; VERSION — الإصدار; SOURCE — مصدر الدنا (بنية صنعية); ORGANISM — اسم المتعضية; REFERENCE — النشرة المرجعية; ORIGIN — التسلسل الكامل

```
 121 gtgtctctta tcagaccgtt tcccgcgtgg tgaaccaggc cagccacgtt tctgcgaaaa
 181 cgcgggaaaa agtggaagcg gcgatggcgg agctgaatta cattcccaac cgcgtggcac
 241 aacaactggc gggcaaacag tcgttgctga ttggcgttgc cacctccagt ctggccctgc
 301 acgcgccgtc gcaaattgtc gcggcgatta aatctcgcgc cgatcaactg ggtgccagcg
 361 tggtggtgtc gatggtagaa cgaagcggcg tcgaagcctg taaagcggcg gtgcacaatc
 421 ttctcgcgca acgcgtcagt gggctgatca ttaactatcc gctggatgac caggatgcca
 481 ttgctgtgga agctgcctgc actaatgttc cggcgttatt tcttgatgtc tctgaccaga
  |   ________   ________   ________   ________   ________   ________
  |   ________   ________   ________   ________   ________   ________
  |   ________   ________   ________   ________   ________   ________
      ________   ________   ________   ________   ________   ________
6121 catgttaagg gcggtttttt cctgtttggt cacttgatgc ctccgtgtaa gggggaattt
6181 ctgttcatgg gggtaatgat accgatgaaa cgagagagga tgctcacgat acgggttact
6241 gatgatgaac atgcccggtt actggaacgt tgtgagggta aacaactggc ggtatggatg
6301 cggcgggacc agagaaaaat cactcagggt caatgccagc gcttcgttaa tacagatgta
6361 ggtgttccac agggtagcca gcagcatcct gcgatgcaga tccggaacat aatggtgcag
6421 ggcgctgact tccgcgtttc cagactttac gaaacacgga aaccgaagac cattcatgtt
6481 gttgctcagg tcgcagacgt tttgcagcag cagtcgcttc acgttcgctc gcgtatcggt
6541 gattcattct gctaaccagt aaggcaaccc cgccagccta gccgggtcct caacgacagg
6601 agcacgatca tgcgcacccg tggccaggac ccaacgctgc ccgaaatt
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

تضم بنوك الدنا الموجودة على الشبكة العنكبوتية تسلسلات النكليوتيدات لجينومات معظم الكائنات الحية ، بالإضافة إلى بلاسميداتها و تسلسلات البنى الصنعية (النواقل Vectors) التي صممها البشر و المستخدمة مخبرياً. أحد أهم بنوك الدنا موجود على صفحات المركز الوطني لعلوم التقانة الحيوية NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). فبعد الدخول إلى المتصفح المذكور يمكن اختيار Genbank من قائمة display ثم البحث عن مورثة أو جينوم أو ناقل ...إلخ. و في مثالنا المبين في الشكل أعلاه بحثنا عن تسلسل الناقل الصنعي pMAL-p2x.

نرى في الشكل المعلومات التي يزودنا بها بنك الدنا عن هذا الناقل الصنعي و تتضمن: الموقع على البنك، اسم الناقل، طوله، براءة اكتشافه، مصدر الدنا ، النشرات المرجعية، التسلسل الكامل...إلخ.

رسم الخرائط الوراثية

نظراً لضخامة المعلومات المخزنة في بنوك الدنا ومن أجل ضغط المساحة ما أمكن، فإن البيانات التي نحصل عليها من بنك الدنا تكون دوماً سيل من النكليوتيدات مصفوفة بشكل أعمدة (من 10 نكليوتيدات) و مرقمة. و تعتبر هذه الطريقة جافة نوعاً ما كما أنه لايمكن تمييز المورثات و الأجزاء الوظيفية أو غير الوظيفية عن بعضها، لذلك من المفيد جداً عمل خريطة وراثية إنطلاقاً من البيانات المقدمة من بنك الدنا.

هناك الكثير من البرمجيات التي تساعد في رسم هذه الخرائط الوراثية و منها البرنامج pDRAW32 المتاح للاستخدام المجاني على صفحة www.acaclone.com و الذي سنتعرف على بعض تطبيقاته في هذه الجلسة و تشمل:

1. رسم خريطة لدنا خطي أو حلقي و تحريرها و تنسيقها بالشكل المرغوب
2. حساب النسب المئوية لثنائيات النكليوتيد GC و AT
3. تحديد مواقع إنزيمات القطع المقيدة restriction enzymes بشكل آلي و ما يتفرع عن ذلك:

- تحديد عدد و أسماء الإنزيمات التي تقطع
- تحديد عدد مرات القطع و أطوال القطع الناتجة

4. تحديد بداية و نهاية كل مورثة (إطار قراءة ORF)
5. تحديد مواقع تنظيم التعبير الجيني كالـ promotors
6. ترجمة تسلسل الدنا إلى الحموض الأمينية الموافقة لها (الحصول على تسلسل البروتين)
7. تصميم البوادئ و حساب خواصها الفيزيائية و الكيميائية (بشكل مشابه لبرنامج Primer dsigner في الجلسة السابقة).
8. مقارنة تسلسلين أو أكثر ببعضهما و إيجاد مناطق التشابه و الاختلاف، أو إيجاد الطفرات.
9. عمل صور رحلان افتراضية للدنا أو ناتج قطعها بإنزيمات معينة

لتشغيل البرنامج:

- اضغط أيقونة pDRAW32 ← فتح نافذة البرنامج الأساسية
- اختر من قائمة ملف ← الأمر new ← enter new sequense ← الحصول على نافذة بيضاء يمكنك كتابة أو لصق التسلسل الذي ترغب في عمل خارطة وراثية له.

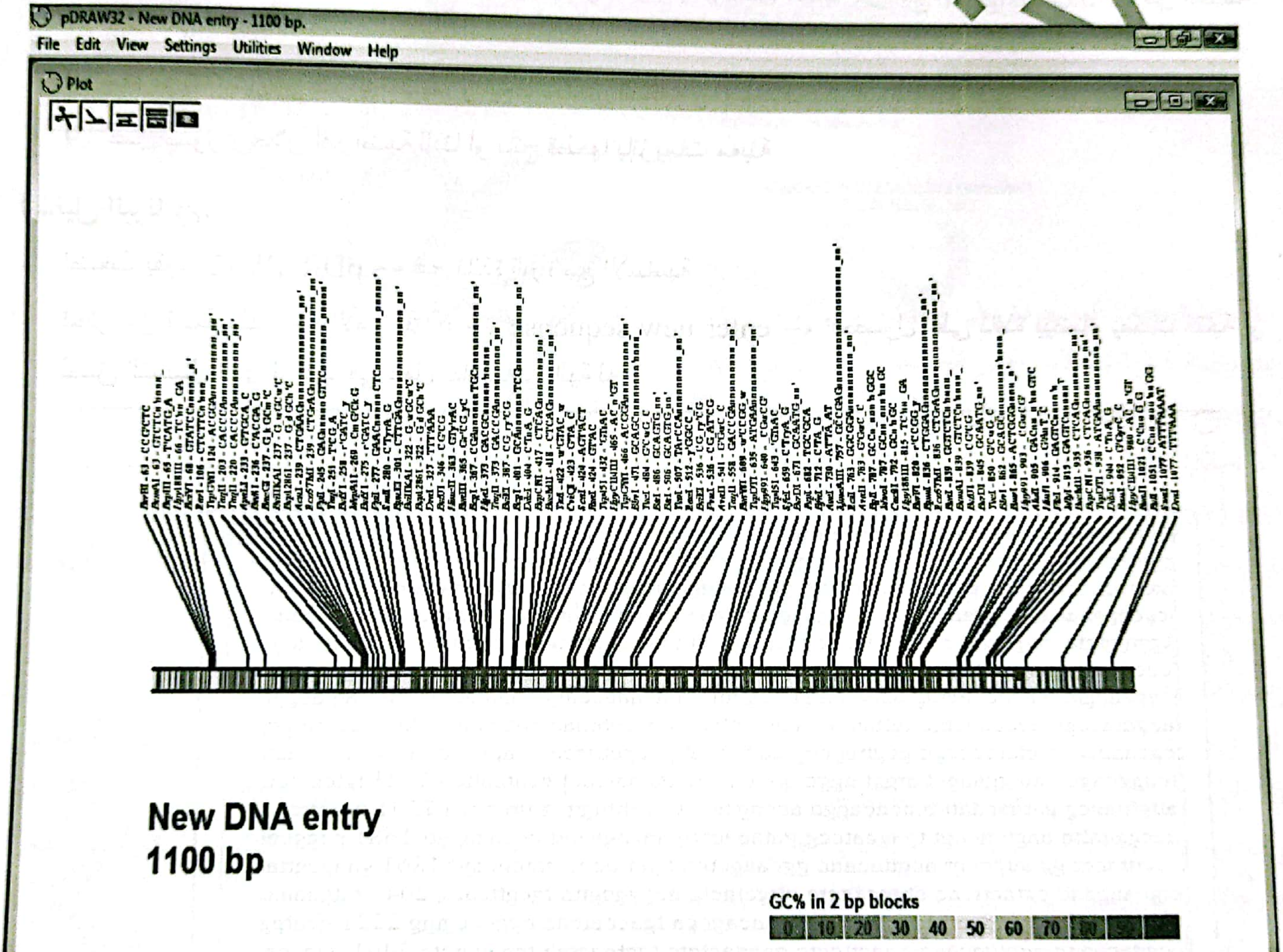
pDRAW32 - New DNA entry - 390 bp.
File Edit View Settings Utilities Window Help

New sequence - use [Ctrl]-V to paste

ccgacaccat cgaatggtgc aaaacctttc gcggtatggc atgatagcgc ccggaagaga 61 gtcaattca
cgcgggaaaa agtggaagcg gcgatggcgg agctgaatta cattcccaac cgcgtggcac 241 aacaac
tggtggtgtc gatggtagaa cgaagcggcg tcgaagcctg taaagcggcg gtgcacaatc 421 ttctcgcg
cacccatcaa cagtattatt ttctcccatg aagacggtac gcgactgggc gtggagcatc 601 tggtcgcatt
cggaacggga aggcgactgg agtgccatgt ccggttttca acaaaccatg caaatgctga 781 atgaggg
acgataccga agacagctca tgttatatcc cgccgttaac caccatcaaa caggattttc 961 gcctgctgg
cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt 1141 cccgact
tcaggcagcc atcggaagct gtggtatggc tgtgcaggtc gtaaatcact gcataattcg 1321 tgtcgctca
attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagccagt ccgtttaggt gttttcacga 1501 gcacttcac
accggaatta aagtcaccgt tgagcatccg gataaactgg aagagaaatt cccacaggtt 1681 gcggca
ccgtttacct gggatgccgt acgttacaac ggcaagctga ttgcttaccc gatcgctgtt 1861 gaagcgttat
ctgcaagaac cgtacttcac ctggccgctg attgctgctg acgggggtta tgcgttcaag 2041 tatgaaaa
tccatcgcag aagctgcctt taataaaggc gaaacagcga tgaccatcaa cggcccgtgg 2221 gcatgg
ccgaacaaag agctggcaaa agagttcctc gaaaactatc tgctgactga tgaaggtctg 2401 gaagcg

Paste | Cancel | OK

- في حالتنا اليوم سنقوم سنفتح الملف pMAL للناقل الصنعي الموضح في بداية الجلسة، وسنقوم بنسخ النكليوتيدات (من 3300 و حتى 4400 حيث نعلم أن هذه النكليوتيدات تشمل مورثة المقاومة للأمبسللين كواصمة انتقائية تميز هذا الناقل).
- قم بلصق التسلسل الذي نسخته في المربع الأبيض ثم اضغط ok ← الحصول على خريطة أولية للتسلسل المدخل new DNA entry كما في الشكل الآتي:



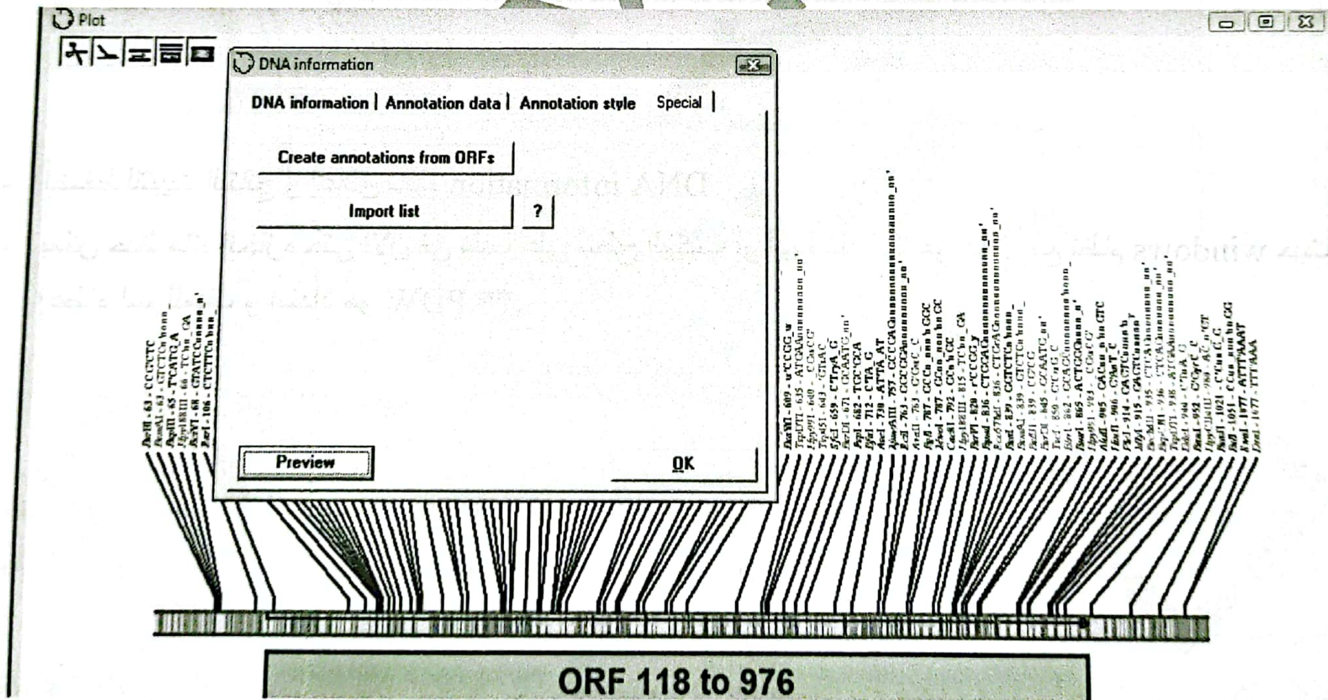
- نلاحظ في الخريطة الأولية طول التسلسل، مواقع التعرف لإنزيمات القطع، توزع الثنائية GC على طول التسلسل، بداية و نهاية المورثة (دون تسمية) ممثلة بسهم أسود رفيع.

لتخصيص الدنا المدخلة:

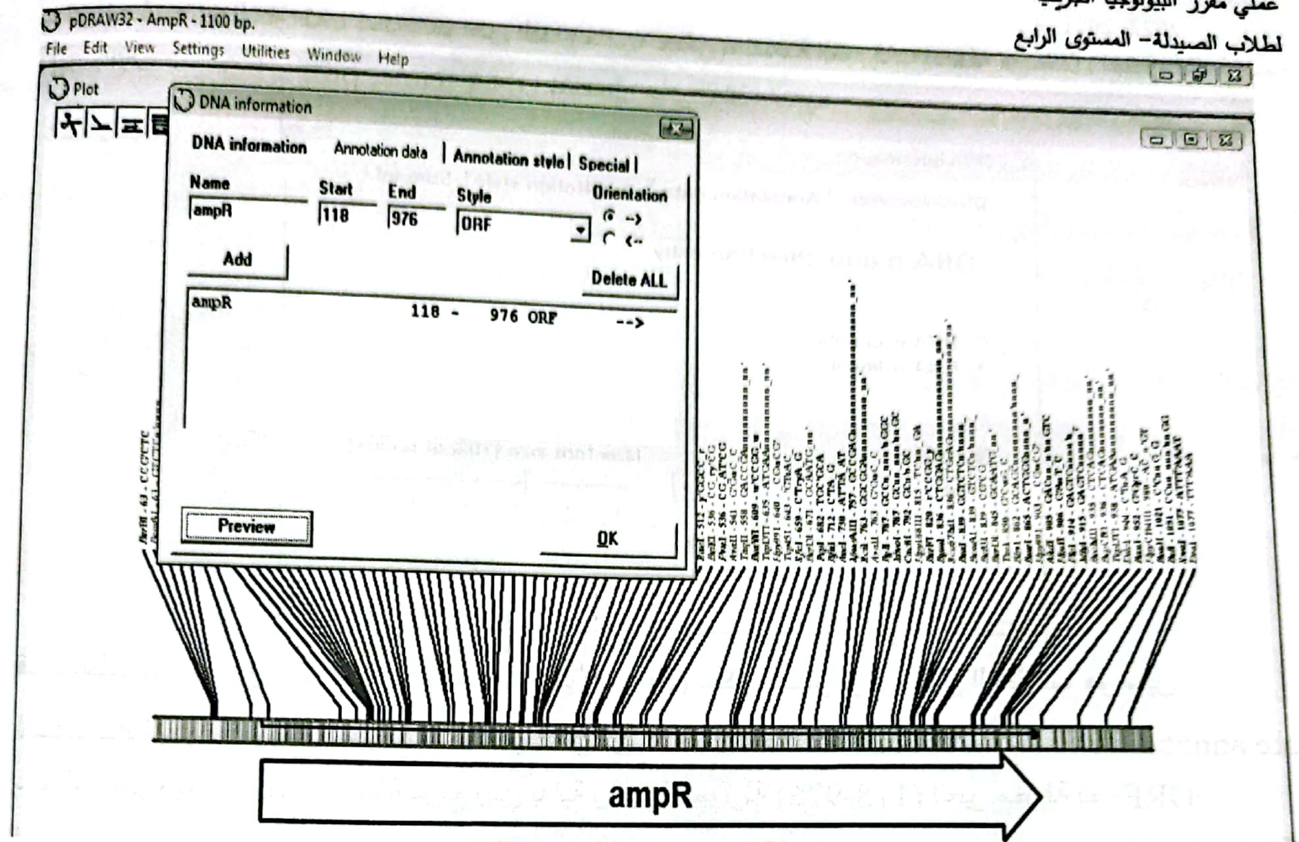
- يمكن إعطاء اسم للخارطة ، تحديد خواص الدنا (حلقي، خطي)، تسمية المورثات بداخله من خلال اختيار قائمة ← edit الأمر ...DNA name, properties فتحصل على النافذة التالية:

DNA information
DNA information | Annotation data | Annotation style | Special |
DNA name: New DNA entry
DNA is circular
DNA is linear
Font
Name
Arial
Max font size (10% of radius)
Color
Bold
Italic
Preview
OK

- قم بإعطاء اسم للدنا و اختر شكله (في حالتنا خطي linear) يمكن اختيار نوع و لون الخط كما هو مبين
- لتحديد بداية ونهاية مورثة المقاومة للأمبسلين اختر من النافذة السابقة قائمةspecial ← اضغط create annotation ← ثم preview ← سيتم إضافة مربع يبين بداية و نهاية المورثة (118-976) الغير معرفة بعد ORF



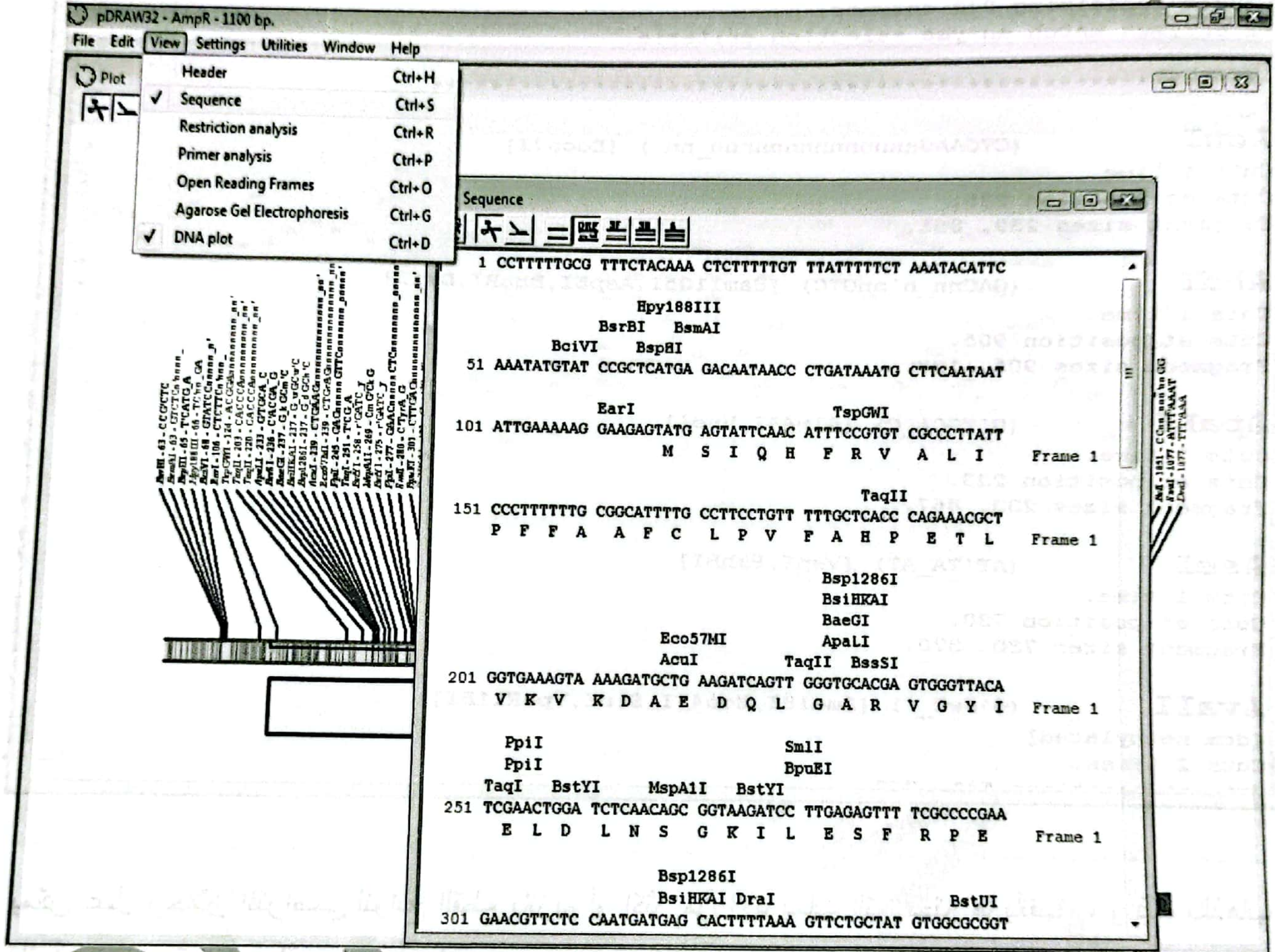
- لإعطاء اسم للمورثة ختر قائمة Annotation data ← ثم أدخل اسم المورثة و بدايتها 118 و نهايتها 976 و نمطها ORF و اتجاهها ← اضغط Add ← ثم preview← يتم تمثيل النتائج بسهم أصفر يمثل المورثة.



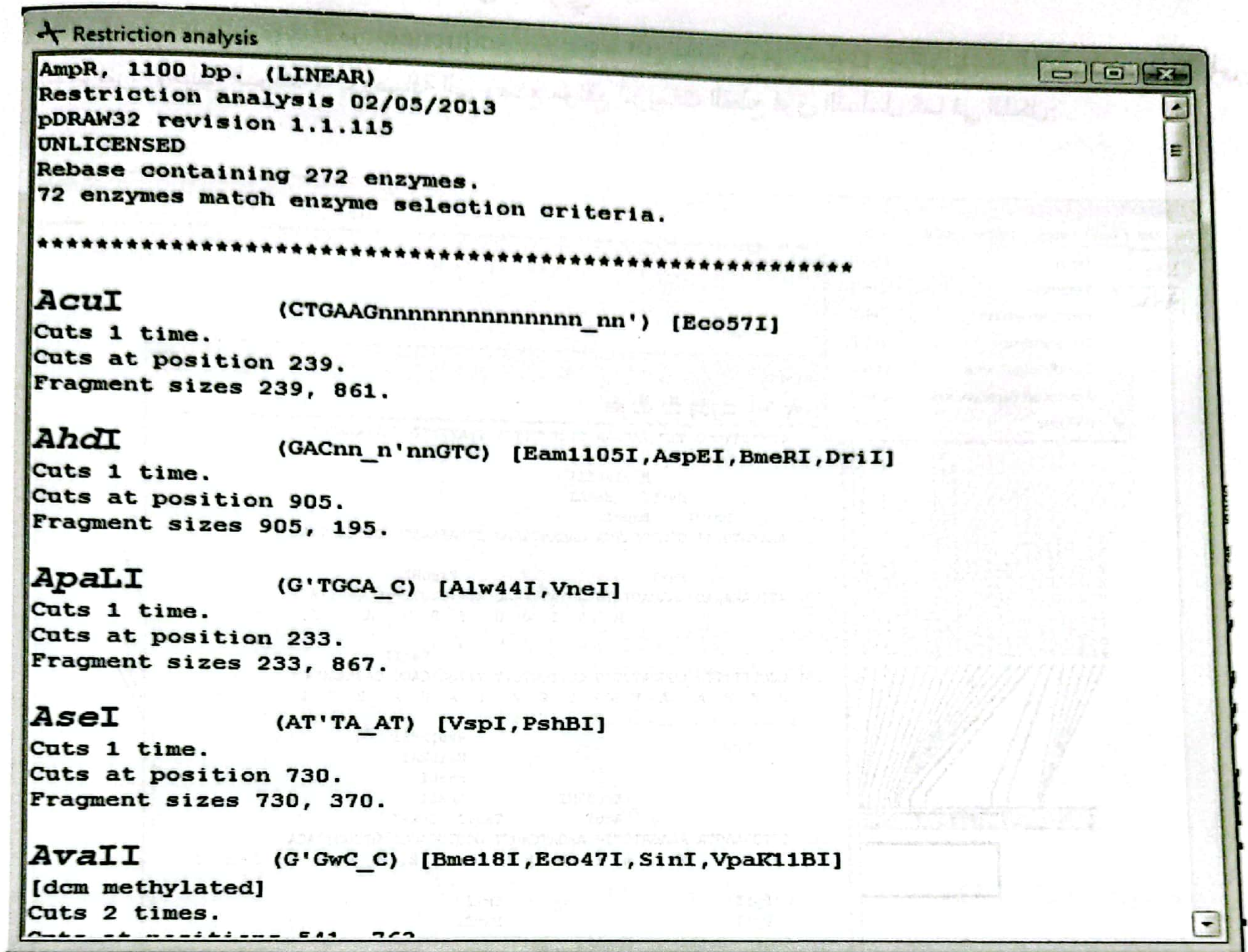
- اضغط لتثبيت النتائج و إغلاق نافذة DNA information
- يمكن حفظ ماتم إنجازه حتى الآن في ملف على سطح المكتب أو أي مجلد كما هو الحال مع نظام windows حيث يتم إعطاء اسم للملف و امتداد هو PDW.**.

ترجمة التسلسل و إظهار مواقع القطع بشكل جدولي

- اختر قائمة view ← الأمر sequence ← سيتم فتح نافذة تظهر تسلسل النكليوتيدات الكامل و ترجمته إلى الحموض الأمينية الموافقة، بالإضافة إلى وضع مواقع إنزيمات القطع فوق التسلسل كما في الشكل:



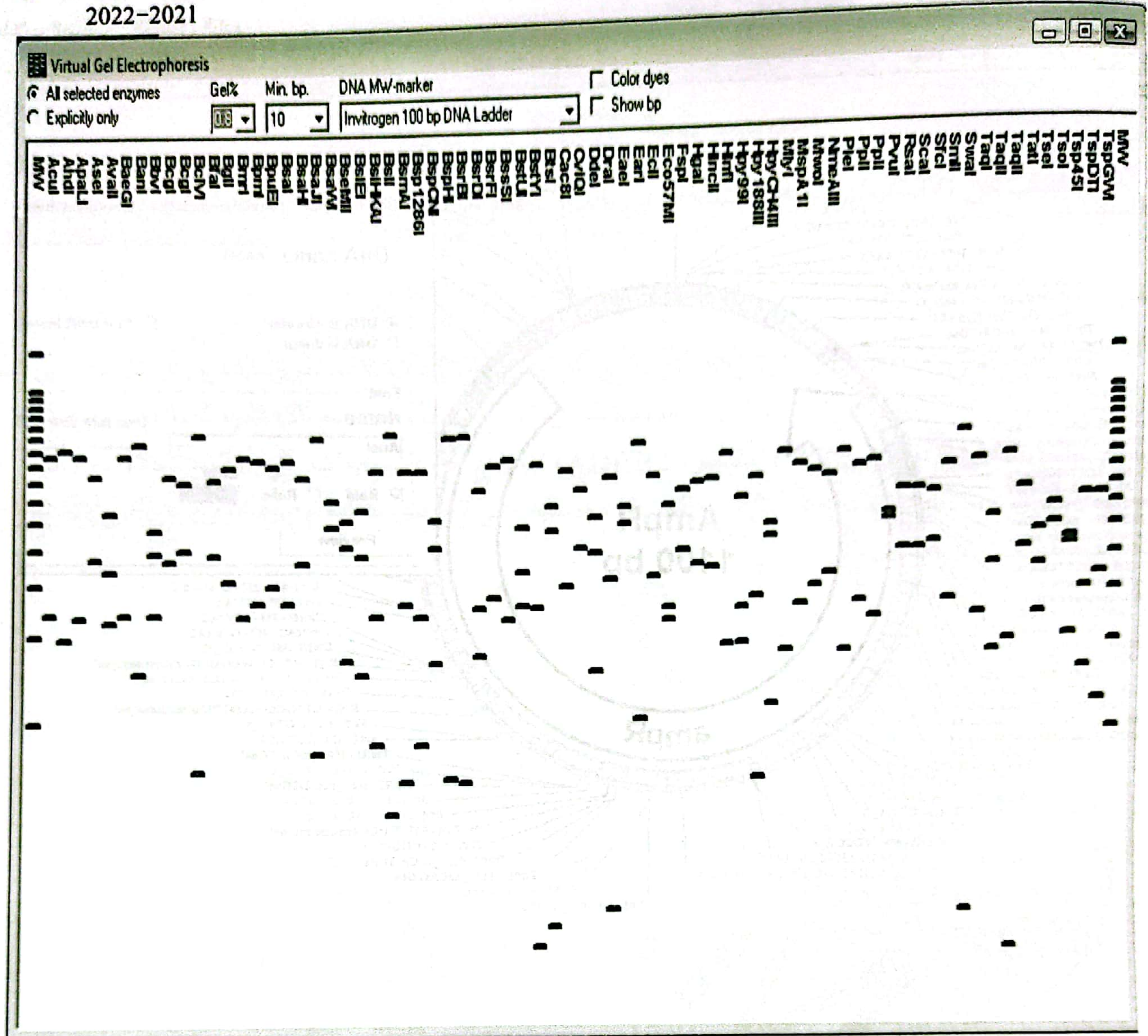
- لتحليل مواقع قطع إنزيمات الاقتطاع اختر قائمة view← الأمر restriction analysis ← ستحصل على جدول بأسماء إنزيمات الاقتطاع ، تسلسل موقع التعرف، عدد المرات التي يقطع فيها الإنزيم و أطوال القطع الناتجة، كما هو مبين في الشكل:
- مثلاً: الإنزيم *Acu*I يقطع مرة واحدة في الموقع 239 و ينتج عن ذلك قطعتين أطوالهما على التوالي 239 و 861 زوجاً نكليوتيدياً

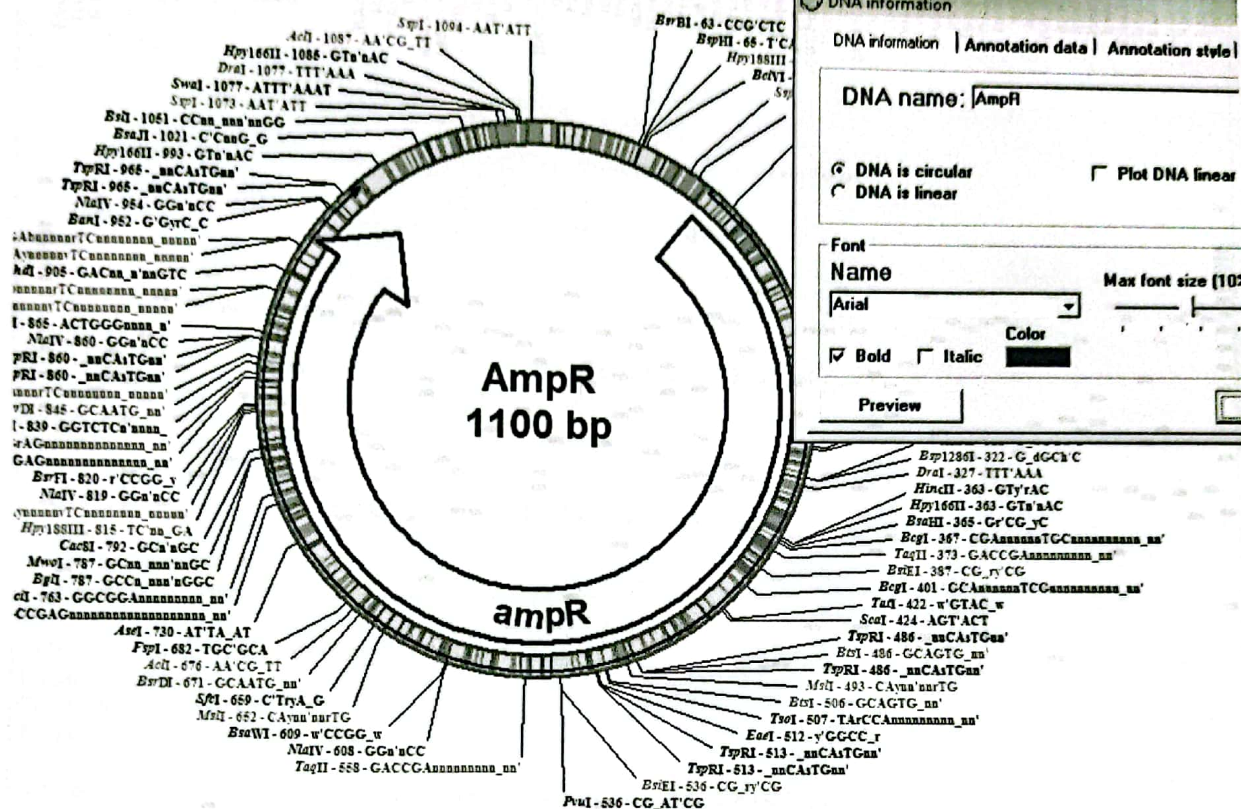


- يمكن عمل رحلان افتراضي لنواتج القطع بإنزيم أو أكثر من الإنزيمات التي نختارها بأنفسنا ، و ذلك بالذهاب إلى قائمة view ثم الأمر Agarose gel

- ستشاهد صورة الرحلان الافتراضية ، حيث تبين عدد الحزم الناتجة من كل إنزيم و مواقعها بالنسبة لسلم دنا (يمكن اختياره)

- يمكن اختيار النسبة المئوية لمادة الأغاروز Gel% في الهلامة، و نوع سلم الدنا DNA MW-marker، و إظهار عصابات الملونات color dyes (سيان،برتقالي، أزرق). كما يمكن إظهار أطوال العصابات باختيار show bp.


Virtual Gel Electrophoresis
All selected enzymes
Explicitly only
Gel%
Min. bp.
10
DNA MW-marker
Invitrogen 100 bp DNA Ladder
Color dyes
Show bp
MW
AcuI
AhdI
ApaLI
AseI
AvaII
BaeGI
BanI
BbvI
BcgI
BcgI
BcIVI
BfaI
BglI
BmrI
BpmI
BpuEI
BsaI
BsaHI
BsaJI
BsaWI
BseMII
BsiEI
BsiHKAI
BslI
BsmAI
Bsp1286I
BspCNI
BspHI
BsrBI
BsrDI
BsrFI
BssSI
BstUI
BstYI
BtsI
Cac8I
CviQI
DdeI
DraI
EaeI
EarI
EciI
Eco57MI
FspI
HgaI
HincII
HinfI
Hpy99I
Hpy188III
HpyCH4III
MlyI
MspA1I
MwoI
NmeAIII
PleI
PpiI
PpiI
PvuI
RsaI
ScaI
SfcI
SmlI
SwaI
TaqI
TaqII
TaqII
TatI
TseI
TsoI
Tsp45I
TspDTI
TspGWI
MW


.00 bp. - [Plot]
ettings Utilities Window Help
DNA information
DNA information | Annotation data | Annotation style |
DNA name: AmpR
DNA is circular
DNA is linear
Plot DNA linear
Font
Name
Arial
Max font size (10
Color
Bold
Italic
Preview
AmpR
1100 bp
ampR
SspI - 1094 - AAT'ATT
PvuI - 536 - CG_AT'CG
ScaI - 424 - AGT'ACT
AseI - 730 - AT'TA_AT
FspI - 682 - TGC'GCA
DraI - 327 - TTT'AAA

د. محمد ياسر عبجي

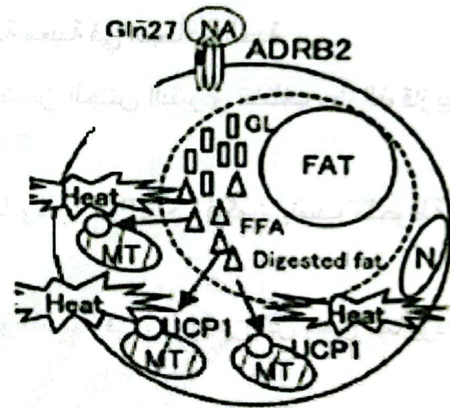
الجلسة الثامنة

استخدام تقنية PCR في التحليل الوراثي

الكشف عن الاستعداد الوراثي للبدانة من خلال تحليل مورثة ADRB2 باستخدام تقنية ARMS

مقدمة نظرية:

هناك العديد من المورثات التي تلعب دوراً هاماً في تنظيم عمليات استقلاب الطاقة و حرق الدهون أو تخزينها في الجسم، وذلك من خلال إنتاجها لهرمونات أو عوامل أو مستقبلات بروتينية غشائية، أحد أهم تلك المورثات المدروسة بشكل جيد هي مورثة المستقبل الأدرنرجي β2 (اختصاراً ADRB2) تتوضع هذه المستقبلات في أغشية الخلايا و لاسيما خلايا النسيج الشحمي ، حيث تربط هذه المستقبلات العوامل العصبية التي تحرض عملية حرق الدهون و إنتاج الحرارة بآلية معقدة كما هو مبين في الشكل.



Large adipocyte

تؤدي الطفرات التي تسبب تغيراً في بنية هذا المستقبل إلى ضعف في قدرته على ربط النواقل العصبية مما يخفض عمليات حرق الدهون و تراكمها في الخلية الشحمية ولاسيما في مناطق البطن و الأرداف مما يؤدي إلى القابلية للإصابة بالبدانة و أمراض استقلابية أخرى (ارتفاع الشحوم، السكر.....).

أحد أشكال التغيرات الوراثية التي يمكن أن تحدث هو التعددية الشكلية وحيدة النكليوتيد SNP (راجع محاضرة الطفرات).

ماهي الـ SNP؟

يقصد به أن يكون لمورثة معينة في جماعة حية نمطان جينيان genotypes ، يختلفان عن بعضهما بنكليوتيد وحيد وبنسبة تواجدهما في الجماعة الحية.

في حالة مورثة ADRB2 يمكن أن تأخذ في البشر نمطين :

1. النمط الأكثر شيوعاً يحوي نكليوتيد السيتوزين في الموقع 79 (.....CAA.....)
2. النمط الثاني الأقل شيوعاً يحوي الغوانوزين في الموقع 79 (.....GAA.....)

يؤدي تبدل C إلى G إلى تبدل الحمض الأميني رقم 27 من Gln إلى Glu و هذا مايسمى تعددية شكلية وحيدة النكليوتيد يرمز لها إما C79G أو Gln27Glu. يؤدي هذا التبديل إلى إضعاف وظيفة المستقبل الغشائي و الاستعداد الوراثي للإصابة بالبدانة.

ملاحظة: يمكن أن يكون الفرد متماثل اللواقح Homozygous لأحد النمطين الوراثيين (الطبيعي أو الطافر) و يمكن أن يكون الفرد متخالف اللواقح Heterozygous ، أي أحد الأليلين يحوي C في حين يحوي الاليل الثاني G

ماالفارق بين الـ SNP و الطفرة؟

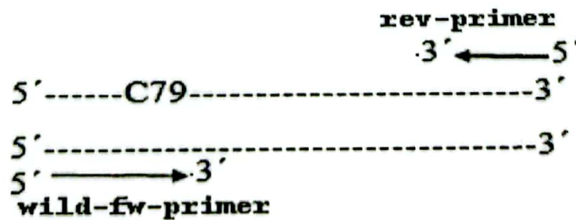
هناك بعض الفوارق نوجزها فيما يأتي:

- التعددية الشكلية وحيدة النكليوتيد SNP توجد بشكل طبيعي و بنسبة معينة في الجماعة الحية.
- تختلف نسبة الـ SNP ضمن نفس الجنس من عرق لآخر (مثلا ضمن الجنس البشري تختلف من القوقازيين إلى الأفارقة).
- نسبة تواجد الطفرات بين أفراد جماعة معينة عادة قليلة جداً، أما وجود الSNP فيكون بنسب ملحوظة (أكثر من1% من أفراد الجماعة الحية لديهم SNP معين)
- لايؤدي الـ SNP إلى تعطيل كامل للوظيفة ولكن قد يسبب زيادة أو نقصاناً في وظيفة بروتين معين مما يؤدي إلى اختلاف النمط الظاهري phenotype للأفراد.

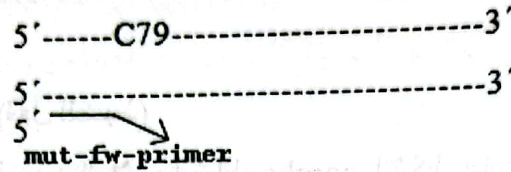
هناك طرق عدة لتحليل لكشف التعدد الشكلي وحيد النكليوتيد ، إحداها هي طريقة ARMS:

تعتمد هذه الطريقة على أخذ عينة دنا من الشخص ثم إجراء تفاعلي PCR باستخدام ثلاثة بوادئ مصممة وفق طريقة خاصة:

- البادئ الأول عكسي و يرتبط على نهاية مورثة ADRB2 و يشار له بـ rev-primer
- البادئ الثاني أمامي و نوعي للنمط الطبيعي wild type، حيث ترتبط النهاية ´3 للبادئ عند النكليوتيد C في الموقع 79، يسمى wild-fw-primer



- البادئ الثاني أمامي و نوعي للنمط الطافر mutant، حيث ترتبط حيث ترتبط النهاية ´3 للبادئ عند النكليوتيد G في الموقع 79، يسمى mut-fw-primer



في أنبوبين منفصلين و باستخدام نفس العينة (من نفس المريض) يتم إجراء تفاعلي الـ PCR الآتيين:

يجرى الـ PCR1 باستخدام البادئين wild-fw-primer , rev-primer

في حين يجرى الـ PCR2 باستخدام البادئين mut-fw-primer , rev-primer

فإذا كان كلا تفاعلي الـ PCR إيجابياً فعندها يكون الفرد متخالف اللواقح و يحوي أحد أليلاته C79 في حين يحوي الأليل الثاني G79. أما إذا كان أحد التفاعلين إيجابياً فيكون الفرد متماثل اللواقح و الجدول التالي يوضح النتائج و تفسيرها:

نتيجة PCR1	نتيجة PCR2	التقييم النهائي
+	+	Hterozygous C/G
+	–	Homozygous C
–	+	Homozygous G
–	–	Invalid

التجهيزات المخبرية:

- حمام مائي
- ماصات ميكروويية مع رؤوس، انابيب PCR قياس 0.2 مل مع غطاء.
- ثلج مع حوامل لأنابيب الـ PCR
- حوض رحلان كهربائي
- جهاز مولد جهد كهربائي (قابل للضبط)
- ملحقات: صواني Trays لصب الهلام ، أمشاط combs لتشكيل آبار wells للعينات .
- جهاز ميكروويف أو سخان.
- أدوات زجاجية: أرلنماير، مقياس مدرج..

المواد و المحاليل اللازمة:

- ماء خالي النكلياز
- وقاء 10X PCR buffer (fermentase) يحوي شوارد كلوريد المغنزيوم (20mM)
- مزيج من النكليوتيدات منقوصة الأوكسجين dNTPs (10mM each)
- بوادئ عدد 3
- محلول حل الخلايا lysis buffer (50 mM NaOH, 0,25% SDS)
- إنزيم *Taq* polymerase (5units/µl)
- مستلزمات الرحلان الكهربائي (كما في الجلسة الثالثة).

د. محمد ياسر عبجي
2022-2021

طريقة العمل

أخذ العينة من المريض و تحضيرها:

- باستخدام ماسحة swap نقوم بأخذ عينة من خلايا الطبقة الظهارية للبطانة الفموية.
- يقص رأس الماسحة و يوضع في أنبوب 1.5 مل يحوي القليل من وقاء حل الخلايا lysis buffer.
- يغلق الغطاء و يوضع الأنبوب على الرجاجة لبضع ثواني، ثم يفتح الغطاء و يخرج رأس الـ swap و يرمى.
- تحضن العينة في الدرجة 90°C لمدة 10 دقائق.
- يضاف للعينة 9 أحجام من الماء منزوع النكلياز ، وبذلك تكون الحلالة الخلوية جاهزة لاستخدامها في الـ PCR.

مزج مكونات الـ PCR.

تجرى جميع الخطوات على حامل أنابيب PCR مبرد مسبقاً.

- يجهز لكل مريض أنبوبا PCR سعة 0.2 ml، ويكتب عليهما اسم المريض و يعطى أحدهما الرقم 1 و الأخر رقم 2.
- يحضر من كل عينة تفاعلي PCR بخلط المكونات كما هو مبين في الجدول الآتي (مع مراعاة تسلسل إضافة المواد):

الحجم المضاف	مكونات الـ PCR1	مكونات الـ PCR2
37.5 µl	H_2O	H_2O
5 µl	10x PCR buffer	10x PCR buffer
1 µl	dNTPs(10mM each)	dNTPs(10mM each)
2 µl	Rev-primer (20µM)	Rev-primer (20µM)
2 µl	wild-fw-primer (20µM)	Mut-fw-primer (20µM)
2 µl	DNA template	DNA template
0.5 µl	Taq-polymerase (5u./ µl)	Taq-polymerase (5u./ µl)

- بعد الانتهاء من إضافة المكونات نمزج جيداً بوساطة الماصة المكروية ، ثم نغلق الأنابيب.

برمجة المدور الحراري و بدء ال PCR

- تتم برمجة المدور الحراري كالآتي:

Stage	temperature	time	Cycles
Denaturing	95°C	2 min	1
	95°C	45 sec	X 30
Hibridiyation	58°C	45 sec	
Elongation	72°C	45 sec	
	72°C	10 min	1

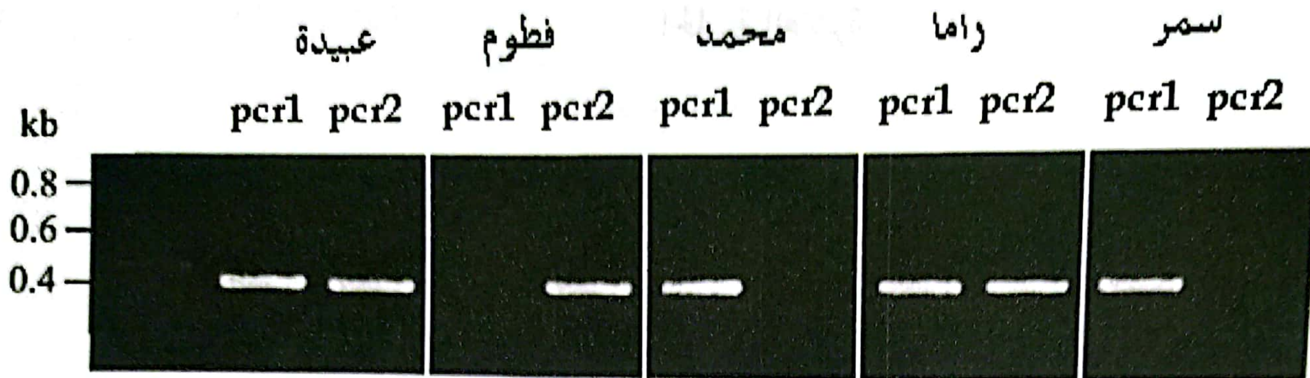
- توضع العينات في الجهاز و نبدأ ال PCR، يستغرق البرنامج حوالي ساعة و عشرون دقيقة.

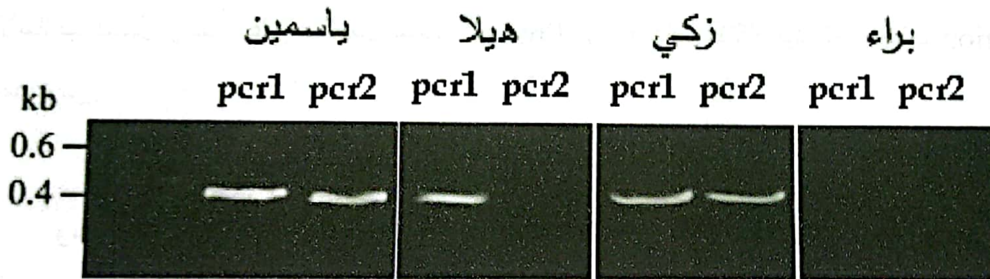
ترحيل العينات و تقييم النتائج

- تصب هلامة آغاروز بتركيز 1.5% حاوية على ملون بروميد الإتيديوم كما مر معنا في جلسة الرحلان الكهربائي.
- يؤخذ 10ميكرولتر من كل عينة ويضاف لها 2 ميكرولتر من صبغة التحميل 6x loading dye
- تحمل العينات على الهلامة و نطبق فرق توتر 100 فولت لمدة 45 دقيقة أو حتى وصول الجبهة الزرقاء على بعد 2سم من نهاية الهلامة.
- يوقف الرحلان و توضع الهلامة على منضدة الـ UV.
- تقيم النتائج وفق الجدول الآتي

التقييم النهائي	نتيجة PCR2	نتيجة PCR1
Hterozygous C/G	+	+
Homozygous C	–	+
Homozygous G	+	–
Invalid	–	–

يكون الأشخاص متماثلو اللواقح للنمط الطافر G/G مؤهبين للأصابة بالبدانة و ما يرافقها من اضطرابات استقلابية.


عبيدة
فطوم
محمد
راما
سمر
kb
pcr1 pcr2
pcr1 pcr2
pcr1 pcr2
pcr1 pcr2
pcr1 pcr2
0.8
0.6
0.4


ياسمين
هيلا
زكي
براء
kb
pcr1 pcr2
pcr1 pcr2
pcr1 pcr2
pcr1 pcr2
0.6
0.4

الجلسة العاشرة

تلطيخ الدنا بطرقة سوذرن

Southern Blot

مقدمة نظرية

بالنظر إلى حزم الدنا بعد تفريقها بهلام الأغاروز وصبغها بالإيثيديوم بروميد نجد أن هذه الحزم تبدو متشابهة مع أن تسلسلات الدنا فيها تكون مختلفة، وحتى إن قطع الدنا التي لها نفس الطول (أي إنها موجودة في نفس الحزمة)، يمكن أن تختلف فيما بينها من حيث تسلسلات الدنا.

وبالطبع فإن تسلسل النيكليوتيدات في جزيء الدنا هو الذي يلعب الدور الرئيس من حيث الوظيفة، ولهذا فقد تم تطوير العديد من الأساليب لتمييز حزم دنا ذات تسلسلات معينة عن غيرها من الحزم الموجودة على الهلام، وترتكز هذه الأساليب بشكل رئيسٍ على استعمال مسابر Probes من عديدات النيكليوتيد يتم تهجينها Hybridization مع ما يتممها الدنا المدروس.

ومن أهم تلك الأساليب التلطيخ الذي يتضمن استعمال مسابر للبحث عن تسلسلات معينة من الدنا بعد فصلها بهلام الأغاروز يسمى تلطيخ سوذرن Southern نسبةً إلى الباحث Ed Southern الذي طور هذه التقنية.

تلطيخ سذرن Southern hybridization

في تلطيخ سذرن يصار إلى فصل قطع الدنا المدروس على هلام الأغاروز ومن ثم نقلها، وتثبيتها على غشاء Membrane بشكل يحافظ على التوضع الذي كانت عليه في الهلام، حيث إنه بعد إجراء الرحلان الكهربائي يتم تمسيخ قطع الدنا المفصولة باستعمال محلول قلوي وهي خطوة مهمة حيث يساعد كون خيوط الدنا مفردة السلسلة في أن يرتبط عليها المسبار الذي يحتوي تسلسلات متممة.

بعد التمسيخ يتم نقل قطع الدنا من الهلام إلى الغشاء، ويمكن إجراء عملية النقل تلك بمساعدة التيار الكهربائي ولكن عادة ما تتم باستخدام الخاصية الشعرية Capillary action حيث يتم وضع الهلام على تماس مع الغشاء ومن ثم يقوم وقاء بتركيبة معينة بالمرور عبر الهلام باتجاه الغشاء فتتحرك قطع الدنا مع حركة الوقاء عبر الهلام إلى الغشاء، وينتهي المطاف بقطع الدنا تلك أن تصبح محتجزة في الغشاء.

وقد كانت أغشية النتروسيللولوز Nitrocellulose تستعمل لهذا الغرض في الماضي بكثرة، وأما الآن فتستعمل أغشية النايلون Nylon membranes، وذلك لأن أغشية النتروسيللولوز سهلة التمزق مما يصعب التعامل معها.

بعد إتمام النقل يتم تثبيت قطع الدنا على الغشاء بحيث لا تنفصل عنه بعد ذلك، ويمكن أن يتم ذلك بأساليب عدة منها الشي Baking بفرن بدرجة حرارة (٨٠°م) أو إجراء عملية الوصل المتصالب Cross-linking باستعمال الأشعة فوق البنفسجية.

ويعتمد هذا الأسلوب الأخير على تشكيل روابط متصالبة بين عدد من ثمالات الثايمين من الدنا مع المجموعات الأمينية والزمر الكيميائية المشحونة إيجابياً الموجودة على سطح غشاء النايلون.

بعد انتهاء عملية التثبيت تبدأ عملية التهجين Hybridization فيتم حضن الغشاء ضمن محلول يحتوي على مسابر موسومة Labelled probes من الدنا أو الرنا مفرد السلسلة.

فصل الدنا على هلام الأغاروز

نقل الدنا إلى الغشاء

إضافة المسبار الموسوم وحيد السلسلة

تعريض الغشاء لفلم حساس

الحزمة تبين موضع الدنا المستهدف

يرتبط المسبار الموسوم (المؤلف من عديد نيكليوتيد) مع التسلسلات المتممة له من الدنا الهدف الموجود على الغشاء، إن هذا الارتباط يفضي إلى ربط المسبار وحيد السلسلة مع الغشاء بروابط هيدروجينية كالتي تربط عادة بين شريطي الدنا في حلزون الدنا المضاعف، يتم غسل الغشاء بشكل متكرر بعد هذا لإزالة كل ارتباط غير انتقائي بين المسبار والغشاء، وإذا لم يكن الضد الأولي موسوماً مباشرةً يتم تقصي الأضداد الأولية بضد ثانوي مناسب يكون موسوماً بشكل مناسب (لونياً أو تألقياً مثلاً)، من ثم يتم الكشف عن مواضع الارتباطات الانتقائية تلك من خلال تعريض الغشاء إلى فلم حساس للضوء .

التجهيزات المطلوبة:

- مستلزمات الرحلان الكهربائي
- حوض بلاستيكي، صفائح زجاجية ، أنابيب تهجين مع غطاء، أثقال معدنية.
- جهاز ربط متصالب UV cross-linker

- فرن تهجين Hybridization oven

المواد و المحاليل:

- ورق واتمان (كرتون) ، محارم ورقية، غشاء نايلون، سولوفان تغليف نايلون شفاف.
- محلول تمسيخ denaturing solution (NaOH 0.5M, NaCl 1.5 M)
- محلول تعديل neutralization solution (NaCl 3M, tris.Cl 1M , pH 7)
- وقاء نقل transfer buffer (10xSSC)
- وقاء ماقبل التهجين prehybridization buffer .
- وقاء التهجين hybridization buffer (6xSSC, SDS 0.5%, denatured DNA 100µg/ml, 50% formamide).
- وقاء غسيل (2xSSC, SDS 0.1%).
- مسابر موسومة isotope-labled probes

طريقة العمل:

ترحل عينة الدنا على هلامة الأغاروز كما مر معنا في الجلسات السابقة، مع فارق وحيد وهو عدم إضافة ملون بروميد الإثيديوم. بعد ذلك تجهز الهلامة لإجراء عملية نقل عصابات الدنا إلى غشاء النايلون، حيث تمسخ الدنا لفصل طاقيها و ذلك بوضع الهلامة في حوض يحوي وقاء التمسيخ denaturing buffer ، مع التحريك (على صفيحة متحركة) لمدة 30 دقيقة. يضاف بعد ذلك وقاء التعديل neutralizing buffer مع التحريك لمدة 10 دقائق.

1. **نقل الدنا إلى الغشاء DNA transfer:**

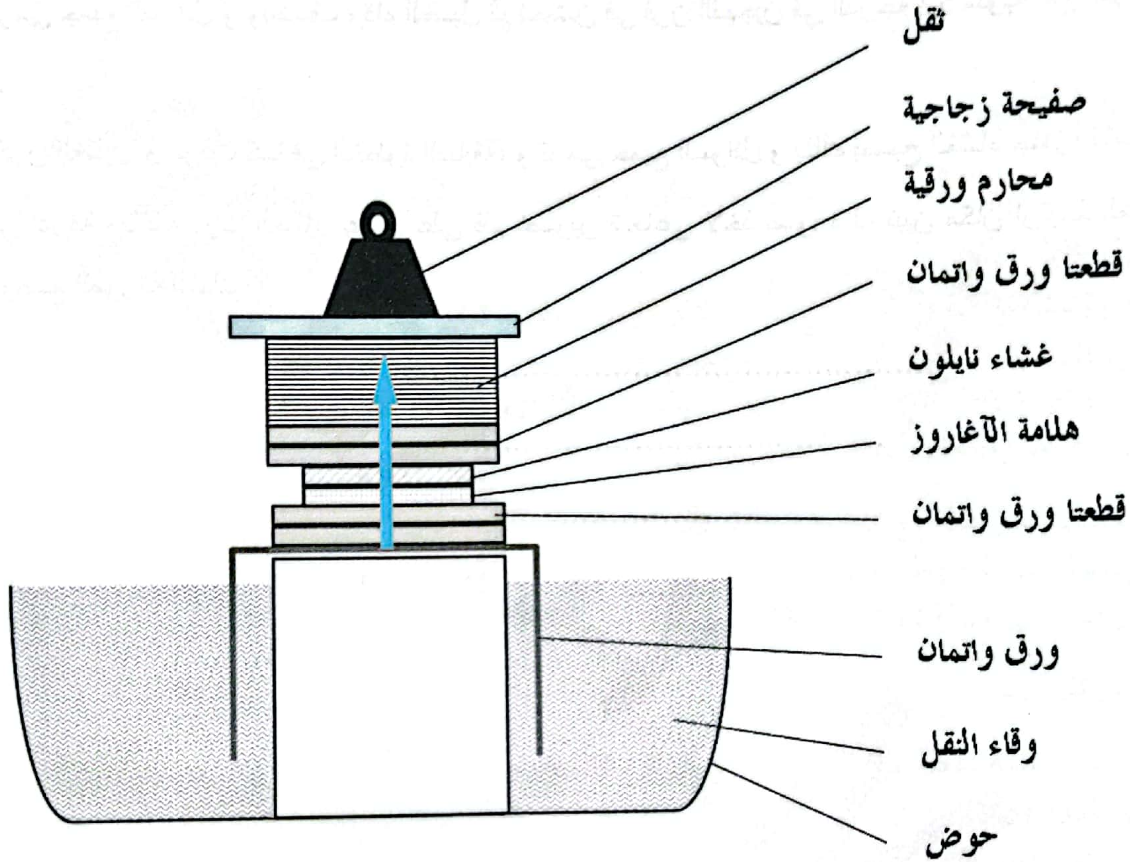
يجري تركيب جهاز النقل كالتالي:

- يؤخذ حوض بلاستيكي و يوضع عليه صفيحة زجاجية تغطيه جزئياً، و تؤخذ شريحة من ورق واتمان و تثنى من طرفيها ثم توضع على الصفيحة الزجاجية بحيث ينزل طرفا الورق في الحوض البلاستيكي.
- يملأ الحوض بوقاء النقل، و تبلل شريحة الورق أيضاً بهذا الوقاء
- نقص قطعتين من ورق واتمان بنفس قياس الهلامة و تبللان بوقاء النقل ثم توضعان فوق بعضهما على سطح شريحة الورق الكبيرة. تزال الفقاعات الهوائية بين شرائح الورق بتدوير قضيب زجاجي على سطح قطعة الورق العليا.

ملاحظة : وجود أي فقاعات هوائية يمنع امتصاص (استشراب) الورق للوقاء في مكان الفقاعات .

- يمد هلام الأغاروز بلطف على الورق و يبلل بوقاء النقل ثم تزال الفقاعات الهوائية بين الهلام و الورق بتدوير قضيب زجاجي على سطح الهلام.

- توضع قطعتي ورق واتمان أخريين على سطح الهلام بعد تبليلهما بوقاء النقل، و تزال الفقاعات كما سبق.
- توضع عدة طبقات من المحارم الورقية على السطح و يغطى المجموع بصفيحة زجاجية، و يوضع على سطحها عدد من الأثقال ويترك المجموع طوال الليل.



2. التهجين Hybridization

- تنزع الأثقال و صفيحة الزجاج والمحارم و يستخرج غشاء النايلون الحاوي على عصابات الدنا و يغمس الغشاء في محلول 6x SSC ثم يوضع في جهاز الـ UV لإحداث ربط متصالب بين الدنا و الغشاء.
- يوضع الغشاء في انبوب تهجين زجاجي مزود بغطاء و يضاف له كمية من وقاء ما قبل التهجين prehybridization buffer و يوضع على الحامل الدوار في فرن التهجين hybridization oven في درجة 42 منوية لمدة 2-4 ساعة.

- نرمي الوقاء ثم نضيف كمية من وقاء التهجين + بضع ميكرولترات من المسابر الموسومة بعنصر مشع isotope-labled probe
- نحضن الغشاء في فرن التهجين مع التدوير طوال الليل.
- ترمى جميع السوائل و ويضاف وقاء الغسيل ثم نحضن في فرن التهجين في الدرجة 52 مئوية مع الدوران لمدة 30 دقيقة.
- يكرر الغسيل 3 مرات كما في الخطوة السابقة، و ترمى جميع السوائل و بذلك يصبح الغشاء جاهزاً للتصوير.
- في غرفة مظلمة يمد الغشاء على على فلم تصوير شعاعي لأخذ صورة له تبين مكان ارتباط المسابر و بالتالي موضع المورثة المطلوبة.

....

....

....

....

الجلسة الحادية عشرة

عزل إنزيم الأميلاز من بذور القمح المنتشة واختبار فعاليته

مقدمة نظرية

عزل البروتينات من النسج:

تتواجد البروتينات في النسج الحيوانية او النباتية إما بشكل منحل في السيتوبلاسما أو مرتبطة مع الغشاء وتبعا لذلك يختلف بروتوكول العزل

1- في حالة البروتينات الحلولة في سوائل الخلية لا يكون الأمر معقدا إذ يكفي تفكيك الأغشية الخلوية للحصول على حلالة خلوية cell lysate تكون غنية بالبروتينات المطلوبة حيث يتم بعد ذلك تنقية البروتين المطلوب بالترسيب أو بإحدى طرق الكروماتوغرافيا (الألفة، التبادل الشاردي، الاستبعاد حسب الحجم) من الأمثلة على ذلك الألبومين والبروتينات الكروية ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة والكثير من إنزيمات الخلية

2-في حالة البروتينات المرتبطة مع الغشاء الخلوي فيتطلب الأمر إضافة عوامل فعالة سطحيا والتحكم بقطبية المحل أو pH المحل للوصول الى الشروط المثلى حيث يغادر عندها جزء من البروتينات الغشاء وينتقل إلى المحل بعد الحصول على هذه البروتينات بشكل حلالة تتم التنقية كما ذكرنا سابقا .

تنقية البروتينات بالترسيب

عندما يوجد البروتين بحالة منحلة في الوسط فانه يميل إلى تشكيل جزيئات متعددة الشوارد وعند تحميض الوسط أو استخدام محاليل ملحية مركزة يؤدي ذلك إلى تقليل إماهة جزيئات البروتين وسحب الماء بشكل كبير فتبدأ جزيئات البروتين بالتجمع على بعضها وتشكيل ترسبات غير منحلة في الماء ومن الأملاح المستخدمة للترسيب نذكر سلفات الامونيوم .

بعد ترشيح الراسب او تثفيله وجمعه ثم غسله يصبح نقيا نقوم بعد ذلك باعادة اذابة الراسب من خلال اعادة الـ pH لوضعها الأصلي واستخدام وقاء مناسب منخفض التركيز الملحي. كل خطوات العمل يجب أن تتم في درجة حرارة منخفضة لتفادي التخرب غير العكوس للبروتينات.

القمح المبرعم و فوائده:

تحتوي حبات القمح المبرعمة على العديد من أنواع الفيتامينات والأحماض الأمينية والمعادن والنشويات مما هو ضروري لسلامة الإنسان والوقاية من مختلف أنواع الأمراض.

- كما يفيد في استعادة الحيوية والنشاط المفقودين عند بعض الأشخاص

- ويستخدم في كذلك معالجة البثور الجلدية و أيضاً تحسين وضع هشاشة العظام بصورة كبيرة جداً لوجود فيتامينات ترمم العظام
- وتساعد عصائر القمح المبرعم على استعادة الشعر المتساقط
- وللقمح المبرعم بعض الأضرار : قد يسبب القمح المبرعم النحافة الزائدة لمن هو نحيف أصلاً إذا كان هناك حساسية من القمح، وعلى العكس قد يسبب السمنة لأنه فاتح للشهية.

إنزيم الأميلاز

تحوي حبوب القمح نوعين من إنزيم الأميلاز هما α- الأميلاز وβ- الأميلاز

α- الأميلاز وزنه الجزيئي صغير (40000 gr/mol) ويتشكل في حبوب القمح عند إنتاشها وظيفته شطر الروابط 1-4 α-glycoside الموجودة في بنية جزيئة النشاء (إنزيم شطر داخلي) أما β-الأميلاز يوجد سلفا في الحبوب قبل إنتاشها بشكل طليعة غير فعالة لكن يتنشط مع بدء إنتاش الحبوب وظيفة β-الأميلاز هي فصل وحدات المالتوز من النهايات غير المرجعة أي انه إنزيم شطر خارجي وهو إنزيم ضخم يبلغ وزنه الجزيئي 5 أضعاف وزن α- الأميلاز لذلك فهو صعب الانحلال والاستخلاص.

تقدر فعالية الأميلاز بالوحدات الدولية وهي كمية الإنزيم التي تكون في شروط محددة قادرة على تخريب 1μmol من النشاء في الدقيقة الواحدة

الاجهزة والادوات

- شاش طبي للترشيح
- مطحنة بن
- مثفلة مع انابيب مثفلة
- بياشر مع عصا تحريك زجاجية
- خلايا ضوئية
- مقياس طيف ضوئي
- انابيب اختبار مع حامل
- حمام مائي

المواد:

- حبوب قمح منتشة (100حبة لكل مجموعة)
- وقاء استخلاص : 3mM $CaCl_2$ وذلك بإذابة 165 ملغ كلوريد الكالسيوم في 500 مل ماء
- وقاء ترسيب (محلول مشبع من سلفات الأمونيوم)
- محلول الركازة substrate: (100مل محلول نشاء 0,2 % + 4 ملغ $CaCl_2$.)
- كاشف اليود في حمض كلور الماء لتحضيره:
  - يحل 1 غ يوديد البوتاسيوم في 2مل ماء

- يضاف 0.5غ يود بلوري
- يمدد الحجم حتى 150 مل بالماء المقطر
- يضاف 600مل من محلول حمض كلور الماء (0.05M) أي تمديد 4:1

طريقة العمل:

أولا- إنتاش (برعمة) حبوب القمح:



لتحضير حبوب قمح مبرعمة (منتشة) نتبع الطريقة الآتية:

يجب استعمال حبوب قمح غير مقشورة لأن الحبوب المقشورة لا تصلح للبرعمة، تغسل الحبوب بماء عادي جيدا و تنقع في وعاء زجاجي (بيشر مثلا) في حوالي ضعف حجمها من الماء مع تغطية فوهة الوعاء بقطعة من الشاش وتترك كذلك طول الليل (12-14 ساعة) .
في صباح اليوم التالي يرمى الماء و تصفى الحبوب قليلا حتى لاتتعفن ثم تعاد للوعاء ويعاد وضع الشاش ويترك الوعاء في مكان معتدل الحرارة و مضاء دون التعرض المباشر لأشعة الشمس. تكرر عملية غسل الحبوب و تصفيتها كل 6 ساعات وفي صباح اليوم التالي تبدأ البراعم بالظهور عندها يوضع الوعاء في براد عادي (دون تجميد) لحفظ الحبوب حتى استعمالها (تتابع البراعم نموها في البراد وقد يصل طولها إلى 10-15 ملم).

ثانيا- عزل خلاصة الأميلاز:

- تطحن عينة شاهدة من بذور القمح الجافة بشكل ناعم وتوضع في بيشر
- تسسحق كمية مماثلة من بذور القمح المنتشة
- يستخلص القمح الجاف المطحون في 50 مل من وقاء الاستخلاص لمدة10دقائق
- أيضا يستخلص القمح المنتش بنفس الطريقة لمدة 10دقائق
- ترشح العينات للتخلص من بذور القمح (ترشح على الشاش)
- تثفل العينات لمدة 15دقيقة (سرعة قصوى)
- نجمع الطور الطافي
- يؤخذ 12 مل من الطور الطافي الناتج عن الترشيح ويضاف له 25مل من محلول كبريتات الأمونيوم المشبع مع التحريك بين الحين والحين لمدة عشر دقائق (في هذه المرحلة يمكن حفظ العينات في البراد للجلسة المقبلة)
- نجمع الراسب بتثفيل العينات لمدة 15دقيقة
- يعاد اذابة الراسب في 12مل من وقاء الاستخلاص حتى الانحلال التام (بالرجاجة) فنحصل على خلاصة لإنزيم الأميلاز

ثالثاً- قياس فعالية إنزيم الأميلاز

1. يأخذ انبوبي اختبار ونكتب على أحدهما قمح منتش وعلى الأخر قمح جاف
2. نضع في كل انبوب 1مل من خلاصة الأميلاز الموافقة
3. نبدأ التفاعل باضافة 2مل من محلول الركازة (النشاء) ونبدأ بقياس الزمن. نعمل سلسلتي قياس واحدة للقمح المنتش (0ثانية,10ثانية,20ثانية ,30ثانية) وأخرى للقمح الجاف (شاهد) (0ثانية,10ثانية,20ثانية,30ثانية)

4. لايقاف التفاعل عند كل نقطة زمنية معينة نضيف 1 مل من محلول اليود الحمضي

ملاحظة:من أجل الأنبوب ذو الزمن صفر نعكس ترتيب الخطوتين 3و4 أي نضيف محلول اليود الحمضي أولا

5. ننتظر 5 دقائق حتى ثبات اللون
6. نحضر محلول ناصع blank (1مل خلاصة الأميلاز +1مل ماء+1مل محلول اليود)
7. نقيس الامتصاصية عند طول موجة λ=620 nm بعد تصفير الجهاز على الناصع .تقاس الامتصاصية لكل نقطة زمنية لكلا السلسلتين ونرسم الخط البياني: علاقة شدة الامتصاص بزمن التفاعل ، يجب أن تتناقص الامتصاصية مع الزمن كدليل نوعي على فعالية الأميلاز.